

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

Matija Poljak

**IZAZOVI U RAZVOJU FORMULACIJA I TEHNOLOGIJA IZRADE
FARMACEUTSKIH OBLIKA PROBIOTIKA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentori rada: prof.dr.sc. Jelena Filipović-Grčić

doc.dr.sc. Donatella Verbanac

Specijalistički rad obranjen je dana 16.12.2015. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu,
Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Ivan Pepić
2. Prof.dr.sc. Jelena Filipović-Grčić
3. Dr.sc. Marjana Dürriegl

Rad ima 69 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jelene Filipović-Grčić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Donatelle Verbanac.

Zahvaljujem svojim mentoricama na stručnoj pomoći oko izrade ovog specijalističkog rada. Veliko hvala kompaniji PharmaS d.o.o. što mi je omogućila upis poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova s ciljem mojeg profesionalnog razvoja, posebno hvala Jerku Jakšiću, mag.pharm. na omogućavanju mog daljnjeg profesionalnog razvoja.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, kojima posvećujem ovaj specijalistički rad.

SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog rada bio je istražiti tehnike oblikovanja i farmaceutske oblike probiotičkih pripravaka, probiotika, odnosno skupiti saznanja u izradi formulacija i potpunom razvoju tih proizvoda. Također, cilj rada je bio na temelju prikupljenih podataka opisati postojeće procese u razvoju farmaceutskih oblika probiotika, dosadašnja saznanja o potencijalnim poteškoćama prilikom razvoja formulacije ili samog oblika, kao i buduće izazove u razvoju farmaceutskih oblika probiotika.

Materijali i metode:

U literaturnoj pretrazi su korištene konstruktivne sintakse kako bi se identificirali potencijalni probiotički proizvodi, tehnologije oblikovanja, farmaceutski oblici i razvoj formulacija. Ciljana pretraga provedena je na bazama MEDLINE/PubMed, Science Direct, Google pretraživaču, putem znanstvenih članaka te dostupnim dokumentima proizvođača i pretraživanjem patenata. Literaturni pregled obuhvaća razdoblje do studenog 2015. i oslanja se na javnodostupne baze.

Rezultati:

Najrazvijenije tehnike oblikovanja mikroorganizama su: liofilizacija (Freeze drying), sušenje raspršivanjem (Spray-drying), hlađenje raspršivanjem (Spray-cooling), fluid-bed aglomeracija i oblaganje u vrtložnom sloju (Fluid-bed agglomeration and Fluid-bed coating), sušenje u vakuumu (Vacuum-drying), oblaganje kompresijom (Compression coating), ekstruzijska tehnika za mikrokapsuliranje u mikrosfere (Extrusion techniques for the microencapsulation in microspheres), adhezija na škrobne granule (Adhesion to the starch granules) i metode na

bazi emulzija (Emulsion-based techniques). Kao najveći izazov u razvoju formulacija potrebno je premostiti nepovoljne uvjete u probavnom sustavu, nizak pH želučanog sadržaja, prisutnost žučnih soli i enzima gušterače, oslobađanje na ciljanom mjestu djelovanja i osigurati što veći broj preživjelih mikroorganizama. Odabirom odgovarajućih ekscipijensa prilikom oblaganja i razvoja formulacije osiguravamo sigurnu dostavu i stabilnost formulacije od procesa proizvodnje, tijekom skladištenja pa sve do dostave u kolon.

Zaključak:

S tehnološke strane gledano, izazov u oblikovanju i proizvodnji probiotika leži u činjenici što su to živi organizmi, osjetljivi na određene uvjete i parametre u proizvodnji, skladištenju i dostavi na ciljano mjesto djelovanja. Nove tehnologije oblikovanja probiotika omogućuju bolju zaštitu samih bakterija prilikom procesa proizvodnje i izrade formulacija, a posebno pri prolasku kroz probavni sustav (nepovoljni utjecaj niskog pH, žučnih soli i enzima gušterače). Veliki broj патената u području oblikovanja probiotičkih proizvoda ukazuje nam na napredak i inovativnost u razvoju takvih proizvoda. Posebnu pozornost treba obratiti na funkciju probiotika kao nosača cjepiva (antigena) i njihovu mogućnost imunizacije.

SUMMARY

Objectives:

The main objective of this study was to investigate: i) techniques of developing; ii) available pharmaceutical forms of probiotics; and iii) get insight into the literature knowledge present in the development of formulations and complete development of products containing probiotic bacteria. Additionally, data were collected to describe the ongoing processes in the development of pharmaceutical forms of probiotics; current knowledge about potential issues in the development of the formulation mainly related to the probiotic delivery systems and associated future challenges.

Materials and methods:

In this investigation were used constructive syntaxes to identify potential probiotic products, formulation technology, pharmaceutical forms and formulation development. Targeted literature search was done on MEDLINE / PubMed, Science Direct, Google search engine, articles in the research journals, available documents of manufacturers and patents. The database searching of the scientific literature includes period up to November 2015.

Results:

The most developed techniques of stabilizing and developing products containing live microorganisms are: lyophilization (freeze drying), spray drying, spray cooling, a fluid-bed agglomeration and fluid-bed coating, vacuum drying, compression coating, extrusion techniques for the microencapsulation in microspheres, the adhesion to the starch granules and emulsion-based techniques. The greatest challenge in the development of specific formulation is to design the product which will be able to overcome the unfavorable conditions in the digestive system (associated with low pH of gastric fluid, the presence of

bile salts, pancreatic enzymes) and assure precise action of viable microorganisms at the targeted site. By selecting suitable excipients in the course of coating and developing formulations one can provide safe delivery and formulation stability during entire manufacturing process, storage and promote successful delivery in colon.

Conclusion:

From the technological point of view, the challenge associated with the probiotics is the fact that they are living organisms, vulnerable to certain conditions during production, storage and delivery to the target site of action in gut. New technologies of developing probiotics formulation provide better protection of the probiotic bacteria during the manufacturing process and formulation development, especially while passing through the digestive system unfavorable conditions such low pH of gastric fluids, presence of bile salts and pancreatic enzymes may occur. A large number of patents in the field of design of probiotic products and formulations show us the progress and innovation in the development of such products. Special attention should be paid to the function of probiotics as vaccines (antigens) carriers and their ability to be used for the purposes of immunization.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA..... | 1 |
| 1.1. PROBIOTICI I MIKROBIOTA..... | 2 |
| 1.1.1. Mikrobiota | 2 |
| 1.1.2. Promjena mikrobiote starenjem čovjeka | 5 |
| 1.1.3. Primjena probiotika | 7 |
| 1.1.4. Mehanizam djelovanja probiotika | 8 |
| 1.1.5. Sigurnost primjene probiotika | 9 |
| 1.2. IZOLACIJA PROBIOTIČKOG SOJA I PROIZVODNJA BAKTERIJA | 11 |
| 1.2.2. Proizvodnja probiotičkih mikroorganizama | 13 |
| 1.3. FARMACEUTSKI OBLICI..... | 16 |
| 1.3.1. Potreba za različitim farmaceutskim oblicima | 16 |
| 1.3.2. Dizajniranje farmaceutskih oblika..... | 17 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 20 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 21 |
| 4. RASPRAVA | 23 |
| 4.1. TEHNIKE OBLIKOVANJA MIKROORGANIZAMA | 23 |
| 4.1.1. Sušenje raspršivanjem (<i>Spray-drying</i>)..... | 26 |
| 4.1.2. Liofilizacija (<i>Freeze drying</i>)..... | 28 |
| 4.1.3. Hlađenje raspršivanjem (<i>Spray-cooling</i>) | 28 |
| 4.1.4. Fluid-bed aglomeracija i oblaganje u vrtložnom sloju (<i>Fluid-bed agglomeration and Fluid-bed coating</i>) | 29 |
| 4.1.5. Sušenje u vakuumu (<i>Vacuum-drying</i>) | 31 |
| 4.1.6. Metode na bazi emulzija (<i>Emulsion based techniques</i>)..... | 31 |
| 4.1.7. Ekstruzijska tehnika za mikrokapsuliranje u mikrosfere (<i>Extrusion techniques for the microencapsulation in microspheres</i>) | 32 |
| 4.1.8. Adhezija na škrobne granule | 34 |
| 4.1.9. Oblaganje kompresijom..... | 35 |
| 4.2. IZAZOVI U RAZVOJU FORMULACIJA..... | 36 |
| 4.2.1. Nizak pH želučanog soka | 38 |
| 4.2.2. Zaštita probiotika odabirom odgovarajućih ekscipijensa | 39 |
| 4.2.3. Patentirane tehnologije dostave probiotika..... | 40 |
| 4.3. OBLICI ZA ORALNU PRIMJENU | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.1. | Primjena u usnoj šupljini | 44 |
| 4.3.2. | Ciljana dostava u GIT-u | 45 |
| 4.3.3. | Suhi oralni oblici | 45 |
| 4.4. | OBLICI ZA VAGINALNU PRIMJENU | 47 |
| 4.5. | TOPIKALNA PRIMJENA PROBIOTIKA | 48 |
| 4.6. | CJEPIVA U PROBIOTIČKIM NOSAČIMA | 51 |
| 4.7. | PROIZVODI NA TRŽIŠTU HRVATSKE | 53 |
| 4.7.1. | Postupak stavljanja na tržište..... | 53 |
| 4.7.2. | Registrirani proizvodi na hrvatskom tržištu | 56 |
| 5. | ZAKLJUČAK | 59 |
| 6. | LITERATURA | 60 |
| 7. | ŽIVOTOPIS..... | 66 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Probiotici su živi organizmi koji, konzumirani u propisanoj količini, pridonose zdravlju domaćina. Mogu biti uklopljeni u različite proizvode, uključujući hranu, lijekove i dodatke prehrani te se kao takvi koriste u prevenciji i terapiji različitih stanja i bolesti. Koncept probiotika kao bakterija koje se unose hranom i djeluju na dobrobit domaćina, razvijen je početkom 20. stoljeća kada je ruski istraživač Ilya Metchnikoff svojim istraživanjem dokazao da obilno konzumiranje fermentiranih mliječnih produkata produljuje i povećava kvalitetu života [1].

Prebiotici su sastojci hrane (najčešće polisaharidi i oligosaharidi koji se ne mogu razgraditi ljudskim probavnim enzimima) koji služe kao hranjive tvari za mikroorganizme koji se nalaze u probavnom traktu čovjeka. Prebiotici omogućuju prevalenciju probiotičkih bakterija nad onima koje mogu dovesti do štetnih učinaka na zdravlje domaćina. Pripravci prebiotika i probiotika nazivaju se sinbiotici. U proteklih nekoliko godina ljudi su postali osvješteniji kako zdravija prehrana i način života imaju veliku ulogu u sprječavanju bolesti i promicanju zdravlja.

Razvoj i napredak probiotika, od sastojaka fermentirane hrane pa sve do terapijske primjene, vidljiv je prema velikom broju istraživanja koji su trenutno u III. fazi kliničkih ispitivanja i proučavaju učinak probiotika na terapiju atopijskog dermatitisa, astme, Chronove bolesti, hepatičke encefalopatije, karcinoma debelog crijeva i utjecaj na ponašanje (djelovanjem na os crijevo-mozak i proizvodnjom serotoninских prekursora) [2,3].

1.1. PROBIOTICI I MIKROBIOTA

Probiotici su živi organizmi koji konzumirani u odgovarajućoj količini pridonose zdravlju organizma domaćina. Probiotici su mikroorganizmi koje dijelimo na bakterije (najvećim udjelom bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije) i kvasce (vrste roda *Saccharomyces*), koji mogu biti prisutni u hrani, dodacima prehrani ili registriranim lijekovima. Među probioticima nema patogenih mikroorganizama, stoga je time njihov potencijalni štetni učinak sveden na minimum, iako rizik kod imunokompromitiranih osoba i dalje nije u potpunosti razjašnjen.

1.1.1. Mikrobiota

Mikrobiota gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja sastoji se od raznih vrsta mikroorganizama koji nastanjuju cijeli probavni trakt. Ti mikroorganizmi čine ogromnu zajednicu kako aerobnih tako i anaerobnih mikroorganizama, uključujući viruse, gljive i parazite. Sastav i raznolikost mikrobiote između i unutar pojedinaca uzrokovan je topografskim i akutnim (privremenim) promjenama mikroorganizama u okolini pojedinca i procesima starenja i sazrijevanja domaćina. Crijevna mikrobiota doprinosi zdravlju i normalnoj probavi razgradnjom (fermentacijom) neprobavljivih izvora energije i sprječavanjem rasta patogenih bakterija. U slučaju da crijevna mikrobiota bude narušena, dolazi do raznih komplikacija i promjena kao što su pretilost, upalna bolest crijeva, različita upalna i druga oboljenja (dijareja, konstipacija, opstipacija, pad aktivnosti imunološkog sustava i dr.) [4].

Tablica 1. Bakterije crijevne mikroflore i njihovi metaboliti.

| METABOLITI | MIKROORGANIZMI | POTENCIJALNA BIOLOŠKA ULOGA |
|--|---|--|
| Kratkolančane masne kiseline (acetat, propionat, butirat, isobutirat, valerat, isovalerate) | <i>Eubacterium, Roseburia, Faecalibacterium i Coprococcus</i> | Snizavanje crijevnog pH, inhibicija rasta patogena, stimulacija apsorpcije vode i Na, sudjelovanje u sintezi kolesterola, dostava energije epitelu debelog crijeva, utjecaj na pretilost, rezistenciju inzulina i kolorektalni karcinom. |
| Žučne soli (kolati, deoksikolati, taurokolati, glikokolati, ursodeoksikolati, glikodeoksikolati, taurokokolati, taurodeoksikolat) | <i>Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacter, Bacteroides, Clostridium</i> | Apsorpcija masti iz hrane i vitamina topivih u mastima, upravljanje lipidnom apsorpcijom, održava barijernu funkciju crijeva, endokrina regulacija triglicerida, kolesterola i glukoze. |
| Metaboliti kolina: metilamin, dimetilamin, trimetilamin, dimetilglicin, betain. | <i>Faecalibacterium prausnitzii, Bifidobacterium</i> | Modulacija metabolizma lipida i homeostaza glukoze. |
| Derivati fenola, fenila i benzoila (hipurna kiselina, benzoična kiselina, tirozin, fenilalanin, 3-hidroksicinamat, fenilacetilglutamin i dr.) | <i>Clostridium difficile, F. Prausnitzii, Bifidobacterium, Subdoligranulum, Lactobacillus</i> | Detoksikacija ksenobiotika, definira sastav i aktivnost mikrobiote. |
| Derivati indola (N-acetiltryptofan, indol, melatonin, melatonin 6-sulfat, serotonin, 5.hidroksiindol i dr.) | <i>Clostridium sporogenes, E. coli</i> | Zaštita stresom-induciranih lezija u GIT-u, modulacija ekspresije proinflamatornih gena, povećanje ekspresije antiinflamatornih gena, utjecaj na os crijevo-mozak i neka neurološka stanja. |
| Vitamini: vitamin K, cijanokobalamin (B12), biotin (B7), folat (B9), tiamin (B1), riboflavin (B2), piridoksin (B6) | <i>Bifidobacterium</i> | Osigurava endogeni izvor vitamina, jača imunološku funkciju, regulira staničnu proliferaciju. |

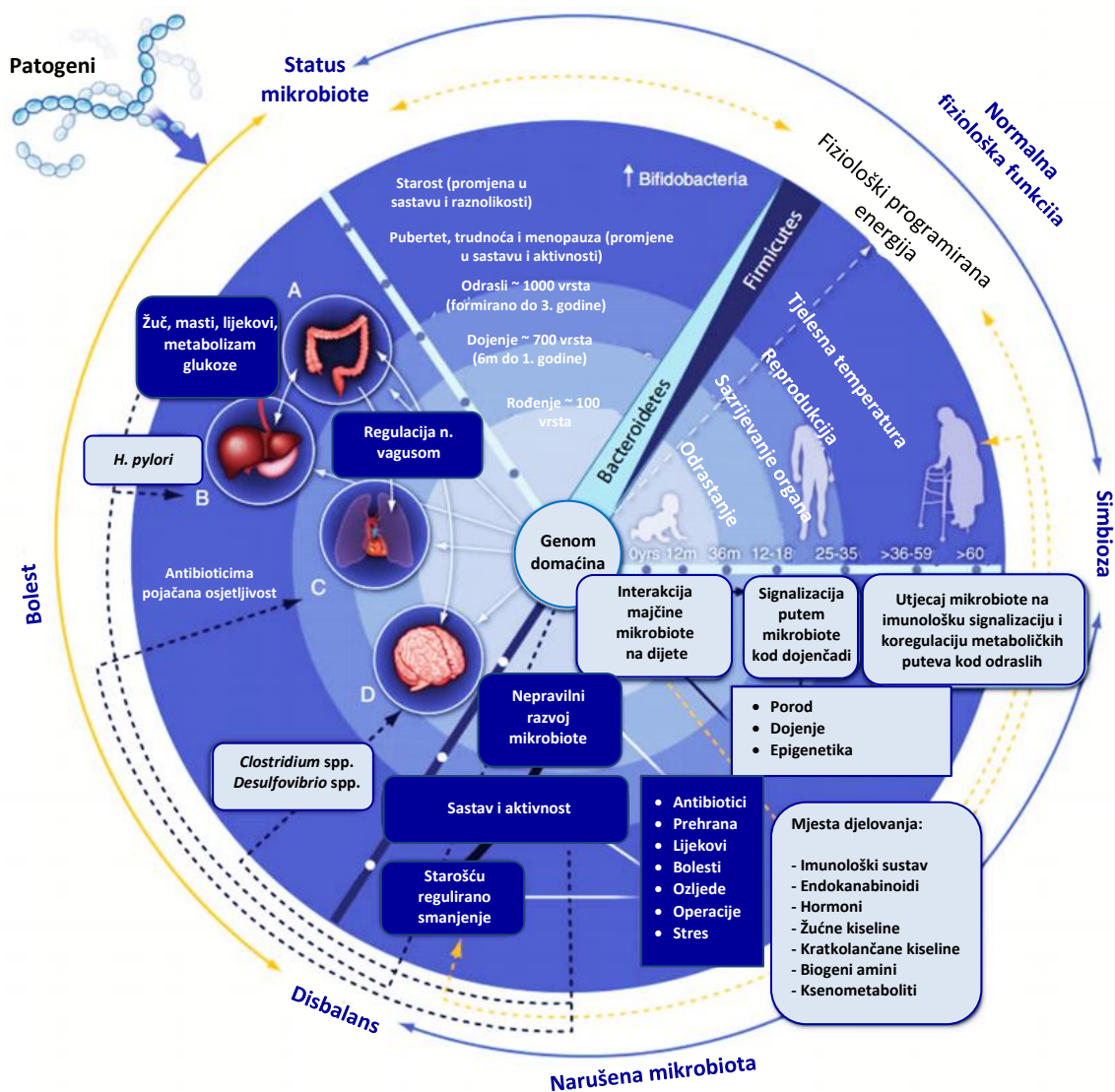
| | | |
|---|--|--|
| Poliamini (cadaverin, spermidin, spermin) | <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium saccharolyticum</i> | Genotoksični učinak na domaćina, protuupalni i antitumorski učinak. |
| Lipidi (konjugirane masne kiseline, LPS, peptidoglikani, kolesterol, fosfatidilkolini, fosfoetanolamini, trigliceridi) | <i>Bifidobacterium</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> | Utječu na crijevnu permeabilnost, aktivacijom osi jetra-mozak reguliraju homeostazu glukoze, konjugirane masne kiseline poboljšavaju hiperinzulinemiju, kolesterol je osnova za proizvodnju sterola i žučnih kiselina. |
| Ostalo: D-laktat, metanol, etanol, sukcinat, lizin, glukoza, urea, kreatin, kreatinin, endocannabinoidi, LPS i dr. | <i>Bacteroides</i> , <i>Pseudobutyrvibrio</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Subdoligranulum</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Lactobacillus</i> | Direktna ili indirektna sinteza metabolita, modulacija vezanih metaboličkih puteva uključujući i sustav endokanabinoida. |

Interakcija mikrobiote i imunološkog sustava domaćina započinje pri samom rođenju. Sastav mikrobiote usmjerava razvoj imunološkog sustava koji nakon toga uzvraća organizmu oblikovanjem sastava crijevne mikrobiote. Ti imunološki regulirani signalni putevi, zajedno sa direktnim kemijskim interakcijama između mikrobiote i domaćina, utječu na funkciju mnogih organa i tkiva kao što su želudac, jetra, mišićno tkivo i mozak [4]. Zajedno sve te interakcije nazivamo metaboličkom osi mikrobiota-domaćin. Tu os definiramo kao interaktivnu kemijsku komunikaciju između specifičnog staničnog procesa domaćina i specifičnih vrsta mikroorganizama. Kao rezultat interakcije dolazi do proizvodnje žučnih soli, kolina, i kratkolančanih masnih kiselina koji definiraju metabolički fenotip domaćina i rizik za pojavu određenih bolesti [4].

Smatra se da je sastav crijevne mikrobiote stabilan tijekom perioda odrasle dobi, ali postoje određene sastavnice koje su biološki i metabolički fleksibilne te na njih mogu utjecati različiti faktori poput stresa ili promjena u prehrani (nezdrava prehrana, neredovita prehrana) i rezultirati promjenom zdravstvenog stanja domaćina.

1.1.2. Promjena mikrobiote starenjem čovjeka

Dječji probavni trakt je sterilan sve do trenutka porođaja, rođenjem dolazi do naseljavanja probavnog trakta mikroorganizmima. Različiti faktori, uključujući i način porođaja (vaginalnim putem ili carskim rezom) i dojenje novorođenčadi, utječu na razvoj mikrobiote (slika1). Kod djece rođene vaginalnim putem dominiraju rodovi *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Atopobium*, dok kod djece rođene carskim rezom mikrobiota po sastavu odgovara sastavu mikroorganizama majčine kože gdje dominiraju stafilocoki [5]. Velike promjene u sastavu mikrobiote događaju se u prvim tjednima života gdje se formira mikrobiota dominantna anaerobnim mikroorganizmima. Taj period se podudara sa aktivacijom osi hipotalamus-hipofiza (HPA) koji ima utjecaj na razvoj dijela živčanog sustava odgovornog za inervaciju probavnog trakta. Starenjem se mikrobiota stabilizira i poprima svoj karakteristični sastav, iako postoje studije koje ukazuju na to da je kod adolescenata povećana prisutnost bifidobakterija i klostridija. Završna promjena u mikrobioti događa se kod stare populacije. Promjene u toj dobi uključuju porast fakultativnih anaeroba, promjene u odnosu vrsta rodova *Bacteroides:Firmicutes* i smanjenju bifidobakterija u ljudi starijih od 60 godina [4].



Slika 1. Mikrobiota u razvoju i bolesti (Prilagođeno prema *Nicholson* i sur., 2012). Utjecaj mikrobiote na ljudsko zdravlje je konstantan, od rođenja pa sve do kasne starosti. Mikrobiota majke može utjecati na intrauterinu okolinu djeteta i postnatalno zdravlje djeteta. Prilikom rođenja oko 100 vrsta mikroorganizama kolonizira kolon novorođenčeta. Utjecaj okoline, prehrane i epigenetike povezani su sa razvojem zdravog probavnog sustava i njegovih mikrobioloških simbiozita. Promjene mikrobiote u mlađim danima mogu utjecati na pojavu bolesti u starosti. Najviše promjena mikrobiota prolazi za vrijeme djetinjstva i u kasnoj starosti kada pada razina bifidobakterija a raste broj *Firmicutes* vrsta. Regulacija tjelesne temperature, reprodukcija i razvoj tkiva su procesi koji zahtijevaju energiju te se oslanjaju i na dio energije koju dobivamo od mikroorganizama crijevne mikroflore. Na raznolikost mikrobiote utječu: genom domaćina, prehrana, stres, bolesti, upotreba antibiotika i ozljede. Promjena

sastava mikrobiote (disbioza) može dovesti do različitih bolesti, uključujući upalnu bolest crijeva (A); rak debelog crijeva, iritabilna bolest crijeva, čir na želucu (B), masna jetra, pretilost i metabolički sindrom; astma, atopija i hipertenzija (C); utjecaj na raspoloženje i ponašanje putem hormonalne signalizacije (D). Crijevna mikrobiota također igra veliku ulogu u metabolizmu lijekova i prevenciji prevalencije patogenih mikroba [4].

1.1.3. Primjena probiotika

Probiotici mogu imati preventivni ili terapijski učinak, ovisno o stanju organizma u koji ih unosimo. Ranija istraživanja terapijskog učinka probiotika temeljila su se na liječenju bolesti probavnog sustava i na komplikacije nastale primjenom antibiotika. Probiotici donose veliku dobrobit našem organizmu, štite organizam od štetnih tvari unesenih hranom, sprječavaju rast patogenih mikroorganizama i mijenjaju pH crijevnog sadržaja kako bi stvorili nepovoljne uvjete za štetne tvari i mikroorganizme. S vremenom je naglasak s terapije prenesen na prevenciju bolesti te se sve više istraživanja provodi u tom smjeru. Kliničke studije koje su provedene na zdravoj populaciji su pokazale da preventivno uzimanje probiotika znatno smanjuje mogućnost razvoja sezonskih prehlada ili infekcija (crijevnih ili respiratornih). Kontroliranim kliničkim ispitivanjima na ljudima dokazani su učinci sojeva probiotičkih bakterija koji smanjuju mogućnost pojave bolesti, a kod djece se posebno dobrim pokazao rod *Lactobacillus* u smanjenju plača i bolova kod dječjih kolika [1].

Tablica 2. Primjeri probiotičkih sojeva [6]

| ROD | VRSTA |
|---------------------------------|---|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>acidophilus</i> <i>reuteri</i> <i>casei</i> <i>rhamnosus</i> <i>johnsonii</i> <i>paracasei</i> <i>plantarum</i> <i>salivarius</i> |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>animalis subsp. lactis</i> <i>longum</i> |
| <i>Bacillus</i> | <i>coagulans</i> <i>subtilis</i> |
| <i>Propionibacterium</i> | <i>freudenreichii subsp. Shermanii</i> |
| <i>Saccharomyces</i> | <i>Boulardii</i> |

1.1.4. Mehanizam djelovanja probiotika

Mehanizam djelovanja probiotika nije u potpunosti razjašnjen. Prema dosadašnjim pretpostavkama probiotici sudjeluju u modificiranju crijevne mikroflore na dva načina [2]. Jedan od mehanizma djelovanja temelji se na lokalnom djelovanju u crijevima a drugi na modulaciji imunološkog odgovora domaćina. Djelujući lokalno, probiotici potiču rast korisnih

bakterija u probavnom sustavu, a istovremeno smanjuju populaciju potencijalno patogenih mikroorganizama (Tablica 3.).

Tablica 3. Mehanizam djelovanja probiotika u probavnom sustavu domaćina, temeljen na interakciji s domaćinom [2].

| | |
|---|---|
| <i>Lokalni učinak u probavnom traktu</i> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Razgrađuju hranu i konzumiraju nutrijente potrebne za rast i razvoj patogena. ▪ Reguliraju pH u crijevima – stvaraju nepovoljnu okolinu za potencijalne patogene. ▪ Hvataju slobodne radikale. ▪ Stimuliraju proizvodnju mucina. ▪ Jačaju crijevnu zaštitnu barijeru. ▪ Natječu se za receptor-vezujuća mjesta s patogenima. ▪ Moduliraju i razgrađuju toksine patogenih mikroorganizama. |
| <i>Modulacija imunološkog odgovora</i> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aktiviraju lokalne makrofage kako bi brže predočili antigen B limfocitima i stimulirali proizvodnju imunoglobulina (IgA) na lokalnoj i sistemske razini. ▪ Smanjuju preosjetljivost na antigene iz hrane. ▪ Moduliraju profil upalnih citokina. |

1.1.5. Sigurnost primjene probiotika

Najvažnija karakteristika probiotika je njihova sigurnost za ljudsko zdravlje, što je i najbitniji čimbenik pri njihovom odabiru za određenu primjenu. U teoriji, probiotici mogu biti

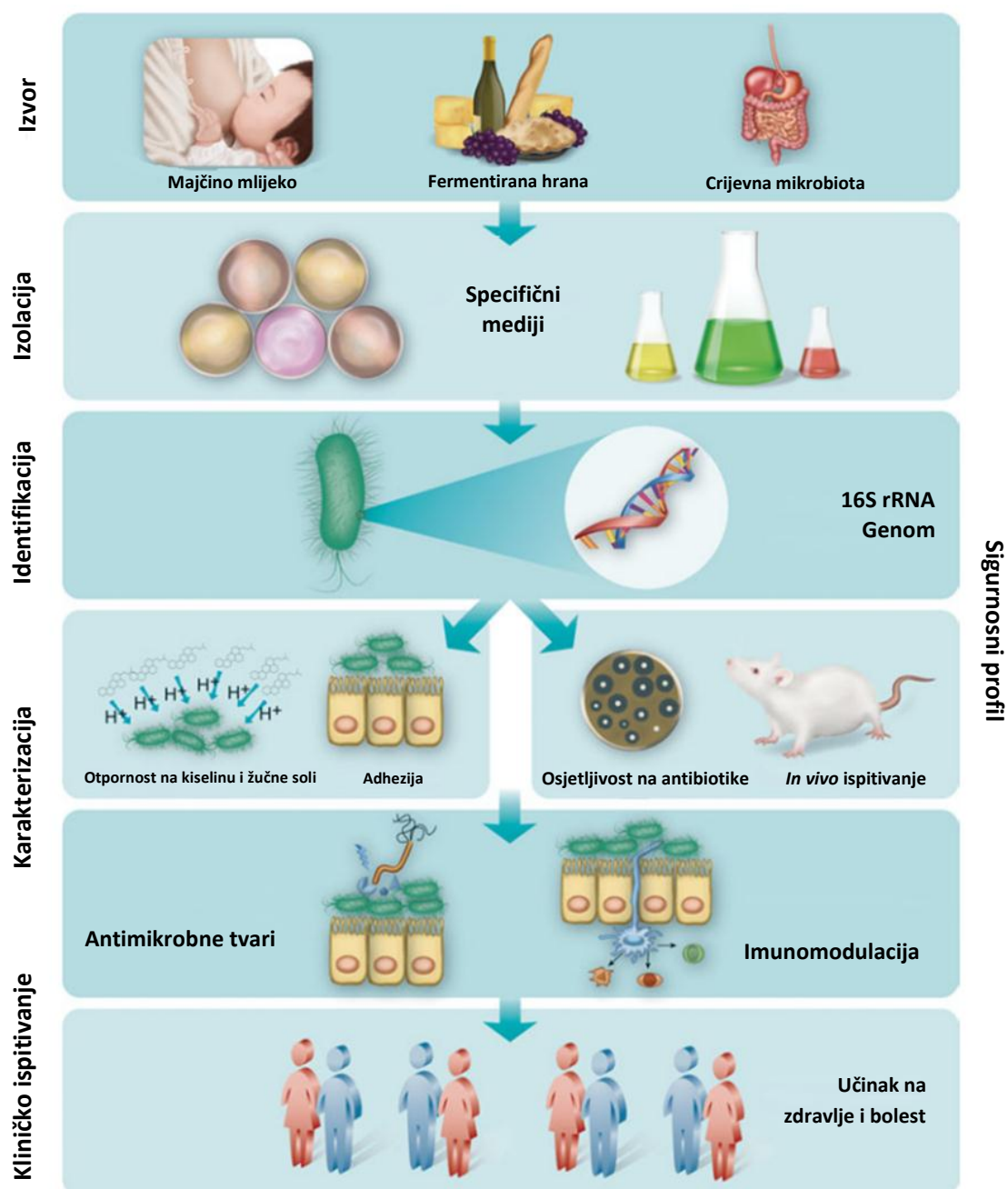
odgovorni za četiri tipa neželjenih učinaka [7]: sistemske infekcije, prekomjernu stimulaciju imunološkog sustava, štetne metaboličke aktivnosti i transfer gena. Učinak probiotika je ovisan o bakterijskom soju, stoga odabrani soj mora biti dobro definiran (fenotipski i morfološki) i karakteriziran. Soj mora biti stabilan i nepromijenjen tijekom proizvodnje i čuvanja, pa sve do dolaska na mjesto primjene.

Probiotici, posebno članovi rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, imaju dugotrajnu povijest primjene i sigurnosti u fermentiranoj hrani i mlijeku. Te bakterije nalazimo i u prirodi oko nas: na biljkama, životinjama i ljudima kao simbiotske organizme. Laktobacile, bifidobakterije, laktokoke i kvasce ubrajamo u sigurne organizme – GRAS (*engl.* Generally Regarded As Safe), no postoje i drugi probiotički sojevi koje ne ubrajamo u GRAS kategoriju [8].

Moguće komplikacije kod primjene probiotika mogu biti pojava sepse, razvoj bakterijemije, endokarditis, toksičnost i metaboličke komplikacije u probavnom traktu te prijenos gena za rezistenciju na antibiotike s probiotika na bakterije crijevne mikroflore [9]. Većina komplikacija kod primjene probiotika javlja se u imunokompromitiranih bolesnika i onih koji se ubrajaju u visokorizične skupine.

1.2. IZOLACIJA PROBIOTIČKOG SOJA I PROIZVODNJA BAKTERIJA

Osnova za procjenu učinkovitosti probiotika u ljudi zahtjeva razumijevanje probiotičkih sojeva, njihovu međusobnu raznolikost, specifičnost i jedinstvenost.



Slika 2. Dijagram toka izolacije, identifikacije i primjene probiotičke bakterije (Prilagođen prema Fontana i sur. 2013).

1.2.1. Identifikacija i karakterizacija probiotika

Kada se govori o izolaciji i karakterizaciji probiotičkih mikroorganizama, posebna pozornost obraća se na određivanje soja, fiziološke karakteristike, prihvatljivost uvjeta u probavnom traktu, rast i razmnožavanje u crijevnoj okolini, utjecaj na imunološki sustav domaćina, antibakterijski agensi, sposobnost kolonizacije, otpornost na uvjete industrijske proizvodnje, sigurnost i učinkovitost. Sve nove probiotičke bakterije odabiru se na osnovu tih kriterija.

Tradicionalne metode karakterizacije zamijenjene su novima, dolaskom genotipskih ispitivanja. Najnovije tehnike uključuju analizu ribosomske RNA (rRNA), odnosno njenih podjedinica 16S i 32S rRNA [10]. Te sekvence sadrže hipervarijabilne podjedinice koje su specifične za svaku vrstu. Korištenjem univerzalnih primera i lančanom reakcijom polimeraze (PCR) možemo odrediti i identificirati bakterijski soj. Najučinkovitija metoda je korištenje specifičnih primera koji omogućuju direktno identificiranje probiotičkog mikroorganizma.

Za određivanje fiziološke karakteristike probiotičkih mikroorganizama koristi se test fermentacije ugljikohidrata i ispitivanje enzimske aktivnosti. Specifični testovi ispituju sposobnost hidrolize žučnih soli i proizvodnju antimikrobnih supstanci.[10]

Preživljavanje mikroorganizama do mjesta djelovanja ključno je za njihovu primjenu u terapijske svrhe. Preživljavanje se proučava obzirom na činjenicu da probiotici moraju preživjeti tri biološke barijere na putu do crijeva: lizozim u slini, niski pH želučanog soka i žučne kiseline u dvanaesniku [10]

Umnažanje probiotika u probavnom traktu doprinijeti će razvoju probiotičke populacije a time i povećanju njihovih metaboličkih aktivnosti (proizvodnju metabolita), odnosno pojačati učinak na organizam domaćina. Rast i aktivnost koloniziranih probiotika može se

pratiti pomoću činjenice da su te bakterije proizvođači kiselina i peroksida pa će količina tih produkata korelirati broju bakterija proizvođača, odnosno njihovim rastom i umnažanjem.

Bakterije mliječne kiseline proizvode različite faktore poput baktericina, antibiotika, mliječne kiseline i peroksida. Te supstance pomažu im u njihovoj kolonizaciji prevenirajući adheziju i rast patogena. Primjerice, bakterije roda *Enterococcus* proizvode posebne baktericine sa inhibitornim učinkom na patogene bakterije roda *Clostridium* i *Listeria* [10].

Živi mikroorganizmi koriste se kao dodaci prehrani za ponovno uspostavljanja crijevne ravnoteže u slučaju disbalansa, stoga je neophodno provoditi detaljna ispitivanja prilikom razvoja probiotičkog proizvoda. Važno je naglasiti kako je svaki mikroorganizam jedinstven na svoj način i zahtjeva dobro poznavanje njegovih karakteristika i svojstava prilikom korištenja.

1.2.2. Proizvodnja probiotičkih mikroorganizama

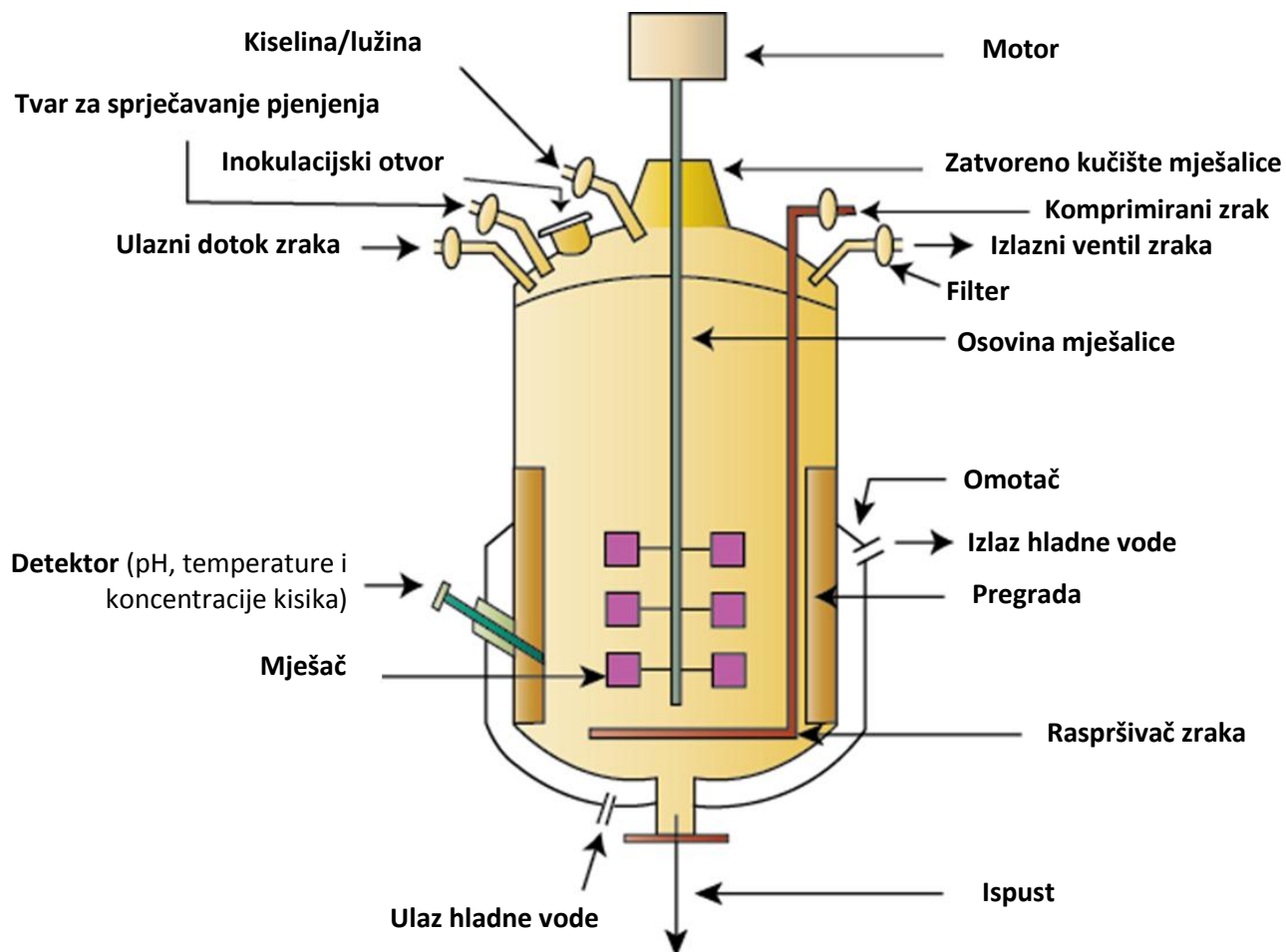
Zbog biosintetskih jedinstvenosti i nedostataka mikroorganizama, pripadnika probiotičkih sojeva, potreban nam je medij čiji je sastav vrlo kompleksan kako bi zadovoljio sve uvjete za rast i proizvodnju. Osnovni sastojci medija za proizvodnju laktobacila su peptidi kao izvor dušika, šećeri (glukoza ili laktoza) kao izvor ugljika, ekstrakt kvasca kao faktor rasta (osigurati će vitamine, aminokiseline, purine i pirimidine), magnezij i mangan u optimalnim koncentracijama. Magnezij, mangan i acetat imaju funkciju faktora rasta ali i inhibiraju rast drugih mikroorganizama, dok citrati inhibiraju rast gram negativnih bakterija. Selektivnost medija za bifidobakterije postiže se dodatkom neomicina, nalidiksinske kiseline i litijevog klorida. Najpoznatije vrste podloga za uzgoj probiotičkih mikroorganizama su: MRS

(de Man, Rogosa, Sharpe), RCM (reinforced clostridial medium) i NPNL (neomycin, paromomycin, nalidixic acid, lithium chloride-based media). [12]

Sastav podloge i uvjeti fermentacije (npr. pH, temperatura, prisustvo kisika, vlaga) imaju veliki učinak na svojstva probiotičkih bakterija koje želimo proizvesti. Nakon odabira odgovarajućeg medija potrebno je razmotriti troškove, proizvodnju što većeg broja bakterija kao i metode sakupljanja bakterija.

Sve veća zainteresiranost za proizvodnju farmaceutskih oblika koji sadrže probiotike zahtjeva i pravilno određene procese industrijske proizvodnje. Problem kod takve proizvodnje stvaraju sekundarni metaboliti samih bakterija koji imaju baktericidni učinak i negativno utječu na rast i razvoj probiotika. Velika osjetljivost probiotičkih bakterija ljudskog porijekla, na uvjete proizvodnog procesa, predstavlja izazov za proizvodnju velikih količina probiotika kao i onih visoke koncentracije.

Na samom početku procesa proizvodnje, mikroorganizmi su inokulirani u reaktor (bioreaktor) koji sadrži odgovarajući medij (podlogu) i provodi se fermentacija sve dok se ne postigne željena količina ili koncentracija bakterija. Tijekom faze rasta i umnožavanja stanica ne dodaju se nikakvi dodatni elementi. Kontrolira se pH, nastajanje pjene i dotok zraka (ukoliko se radi o aerobnim mikroorganizmima) [12].



Slika 3. Prikaz tipičnog bioreaktora. (Prilagođeno prema: NPTEL, <http://nptel.ac.in/>, preuzeto 23-09-2015.)

Kod kontinuirane fermentacije, kontinuirano se dodaje svježije napravljen medij (podloga), a istovremeno se uklanja iskorišteni medij (podloga) u istom omjeru.

1.3. FARMACEUTSKI OBLICI

Ljekovite aktivne tvari su rijetko aplicirane samostalno, puno češće ih susrećemo u obliku različitih formulacija gdje se nalaze u kombinaciji sa nekoliko inaktivnih sastavnica. Selektivni odabir inaktivnih supstanci, znanih kao pomoćne tvari (ekscipijensi), omogućuje nam razvoj farmaceutskih oblika različitih vrsta. Odabrane farmaceutske komponente otapaju, suspendiraju, učvršćuju, razrjeđuju, emulgiraju, stabiliziraju, određuju boju, dodaju/maskiraju okus i u potpunosti doprinose izgledu farmaceutskog oblika. Svaki farmaceutski oblik je jedinstven po svojim fizikalno-kemijskim i farmaceutskim karakteristikama [13].

Ispravan dizajn i izrada formulacije farmaceutskog oblika zahtijeva uzimanje u obzir fizičkih, kemijskih i bioloških karakteristika svih aktivnih i pomoćnih tvari u formulaciji. Lijek i pomoćne tvari moraju biti međusobno kompatibilni kako bi se osigurao gotovi oblik koji će biti stabilan, učinkovit, siguran, atraktivan i jednostavan za primjenu. Farmaceutski oblici se proizvode pod nadležnošću kontrole kvalitete u svim segmentima proizvodnog procesa te se čuvaju u spremnicima koji osiguravaju stabilnost gotovog oblika.

1.3.1. Potreba za različitim farmaceutskim oblicima

Osim potrebe za sigurnom i prikladnom dostavom određene doze lijeka, formiranje ljekovitih oblika potrebno nam je iz još nekoliko razloga [13]:

- a) Zaštita ljekovite tvari od štetnih utjecaja atmosferskog kisika i vlage (obložene tablete, zapečaćene ampule),
- b) Zaštita ljekovite tvari od utjecaja želučane kiseline (filmom obložene tablete),

- c) Zaštita od slanog, gorkog ili neugodnog okusa i mirisa koji dolazi od ljekovite tvari (kapsule, obložene tablete, sirupi i suspenzije različitih voćnih okusa),
- d) Osigurati tekuće oblike ljekovitih tvari koje nisu topljive ili su nestabilne u tekućim oblicima (suspenzije),
- e) Osigurati bistre farmaceutske oblike (sirupi i otopine),
- f) Osigurati kontroliranu dostavu lijeka (tablete, kapsule, suspenzije i depo implatanti kontroliranog oslobađanja),
- g) Osigurati optimalan učinak lijeka putem topikalne primjene (masti, kreme, transdermalni flasteri i oftalmički, ušni i nazalni pripravci),
- h) Omogućiti uklapanje lijeka u tjelesne šupljine (rektalni i vaginalni supozitoriji),
- i) Osigurati dostavu lijeka direktno u krvotok ili tkivo (injekcije i depo implatanti),
- j) Osigurati optimalan učinak lijeka kod inhalacijske terapije (inhalati i inhalacijski aerosoli).

1.3.2. Dizajniranje farmaceutskih oblika

Prije uklapanja aktivne supstance u formulaciju i dozirni oblik, potrebno je kompletno definirati željeni proizvod i razraditi plan razvoja proizvoda. U početku se naprave različite početne formulacije željenog proizvoda te se testiraju (oslobađanje aktivne tvari, bioraspoloživost, učinkovitost, fizikalna i kemijska stabilnost) i koriste u proizvodnji pilot serija, kao i uvećanju proizvodne skale s laboratorijske u pogonsku/industrijsku, ovisno o kapacitetima proizvodnog pogona (tzv. scale-up). Ona formulacija koja najbolje odgovara zahtjevima farmaceutske kvalitete, odabire se kao glavna formulacija i prema njoj se proizvodi željeni proizvod. Sve ostale serije istog proizvoda moraju biti proizvedene prema specifikaciji i zahtjevima koji su identični glavnoj formulaciji.

Postoje različite vrste oblika u koje možemo uklopiti ljekovitu tvar kako bi osigurali sigurnu i učinkovitu primjenu lijeka. U velikom broju slučajeva proizvođači za jednu aktivnu tvar proizvode nekoliko različitih oblika i jačina. Prije proizvodnje više dozirnih oblika jedne aktivne ljekovite tvari, u obzir se uzima nekoliko faktora kao što je priroda bolesti, mjesto dostave lijeka (lokalno ili putem sistemske cirkulacije), dob i suradljivost pacijenata.

Ukoliko se radi o lijeku kojim želimo postići sistemski učinak oralnim putem primjene, oblik odabira biti će tablete ili kapsule jer su one najjednostavnije za primjenu i samostalno uzimanje terapije kod pacijenata. Kod lijekova koji se primjenjuju u hitnim slučajevima, kada pacijent nije sposoban uzeti lijek oralnim putem (stanje šoka i anafilaktičke reakcije), proizvode se injekcijski oblici. Postoje još mnoga stanja u kojima je potrebno razmotriti idealno rješenje za primjenu lijeka i razvoj odgovarajućeg oblika za odgovarajući put primjene [13].

Važnu ulogu u dizajniranju određenog oblika ima i dob ciljane populacije. U pedijatrijskoj populaciji više se koriste tekući farmaceutski oblici u odnosu na krute. Ti tekući oblici su vodene otopine, sirupi ili suspenzije različitih okusa koji se primjenjuju kapaljkom ili žlicom direktno u usta, ili se mogu dodavati hrani. Tijekom djetinjstva i kod starije populacije (65+) pacijenti mogu imati poteškoća s gutanjem te kruti oralni oblici nikako nisu prikladni za tu populaciju. Zbog toga se neki lijekovi uklapaju u oblik tableta za žvakanje ili raspadljive tablete za usta. U usporedbi sa tabletama, kapule se puno lakše primjenjuju i lakše se gutaju. Ukoliko se kapsula malo navlaži u ustima prije gutanja, ona će postati klizava i lakše će kliziti niz grlo u kombinaciji sa vodom. Ukoliko osoba ima problema sa gutanjem kapsula, moguće ih je otvoriti i sadržaj istresti u žličicu zajedno sa medom ili marmeladom kako bi se zamaskirao neugodan okus lijeka [13].

Sa izazovima formulacije lijekovite supstance u odgovarajući farmaceutski oblik, svakodnevno se susreću znanstvenici koji koriste svoje znanje stečeno na iskustvu drugih, kemijski sličnih lijekova i primjenom odgovarajućih fizikalnih, kemijskih, bioloških i farmaceutskih znanja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je istražiti tehnike oblikovanja i farmaceutske oblike probiotika, odnosno saznanja u izradi formulacija i kompletnom razvoju proizvoda koji sadrže probiotičke bakterije.

Također, cilj rada je bio na temelju prikupljenih podataka opisati postojeće procese u razvoju farmaceutskih oblika probiotika, dosadašnja saznanja o potencijalnim problemima prilikom razvoja formulacije ili samog oblika, kao i buduće izazove u razvoju farmaceutskih oblika probiotika.

Naime, poznavanje procesa u razvoju farmaceutskih oblika osigurava bolje snalaženje i razumijevanje prilikom razvoja novog proizvoda. Veliki izazov u razvoju formulacije predstavljaju probiotičke bakterije jer su one živi organizmi te kao takvi zahtijevaju posebne uvjete u postupku proizvodnje, skladištenja i dostave na mjesto primjene.

3. MATERIJALI I METODE

Kao materijal za izradu ovog teorijskog rada poslužiti će znanstveni članci koji daju pregled razvoja probiotičkih proizvoda, te trendova u farmaceutskoj tehnologiji i proizvodnji probiotičkih proizvoda.

U pretrazi su korištene konstruktivne sintakse kako bi se identificirali potencijalni probiotički proizvodi, tehnologije oblikovanja, farmaceutski oblici i razvoj formulacija. Ciljana pretraga bila je na bazama MEDLINE/PubMed, Science Direct, Google pretraživaču, člancima istraživačkih časopisa, dostupnim dokumentima proizvođača i patentima. Pretraživanje znanstvene literature trajalo je do studenog 2015. godine, oslanjajući se na javnodostupne baze prikazane u Tablici 4. Ključni pojmovi u pretraživanju su: probiotici, mikrobiota, proizvodnja probiotika, tehnologija proizvodnje probiotika, farmaceutski oblici, mikrokapsuliranje, liofilizacija, izrada formulacija, fermentacija probiotika, kapsuliranje probiotika, sušenje raspršivanjem.

Dodatna pretraživanja bila su putem brendova i specifičnih naziva proizvoda koji sadrže probiotike i farmaceutske oblike obuhvaćene ovim specijalističkim radom.

Pretraživanje gotovih proizvoda koji spadaju u domenu istraživanja ovog specijalističkog rada provedeno je u javnim ljekarnama na području grada Zagreba (Hrvatska), te su u radu tablično prikazani svi farmaceutski oblici proizvoda koji sadrže probiotičke bakterije dostupni na tržištu Republike Hrvatske.

Tablica 4. Prikaz javnodostupnih baza korištenih za pretraživanje literature u svrhu izrade specijalističkog rada.

| IZVOR | LOKACIJA |
|---|---|
| MEDLINE/PubMed (US National Library of Medicine) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed |
| ScienceDirect | http://www.sciencedirect.com/ |
| Medscape | http://www.medscape.com/pharmacists |

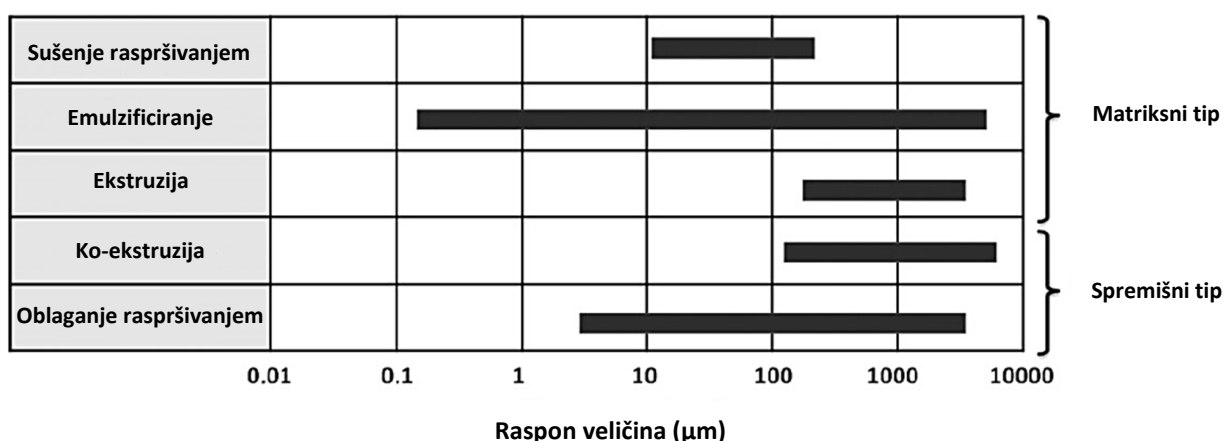
4. RASPRAVA

4.1. TEHNIKE OBLIKOVANJA MIKROORGANIZAMA

Važnost tehnika oblikovanja farmaceutskih oblika koji sadrže probiotike je u sigurnoj dostavi bakterija na predviđeno mjesto. Vrlo je kompleksno razviti formulu i odabrati odgovarajuću tehniku oblikovanja, obzirom da probiotičke bakterije moramo zaštititi od vrlo nepovoljnog (niskog) pH želučanog sadržaja, a opet s druge strane osigurati njihovu aktivaciju, rast i razmnožavanje na ciljanom mjestu njihova djelovanja. Jedna od takvih tehnika je mikrokapsuliranje i stanična imobilizacija. Mikrokapsuliranje i stanična imobilizacija probiotičkih bakterija osiguravaju njihovu zaštitu od nepovoljnog pH želuca, preživljavanje i aktivnost na ciljanom mjestu dostave, a također i preživljavanje u dugotrajnim skladišnim uvjetima.

Tehnologija mikrokapsuliranja probiotika (TMP) je novija grana biofarmacije koja se pojavila i ubrzano počela razvijati u prošlom desetljeću. Bazirano na toj tehnologiji, široki spektar mikroorganizama uspješno je imobiliziran u semipermeabilnim i biokompatibilnim materijalima koji imaju sposobnost modulacije dostave živih stanica na ciljano mjesto u organizmu. Neke od tehnika imobilizacije prikazane su na slici 5., a oblik dobivenih čestica na slici 6. Potencijalne prednosti ovakve tehnologije su zadržavanje što većeg preživljavanja živih organizama prilikom prolaska kroz nepovoljne uvjete (niski pH želuca i dr.) do mjesta dostave u organizmu [14]. Zaštita bioaktivnih tvari kao što su vitamini, antioksidansi, proteini i lipidi može se postići upravo korištenjem tehnologija mikrokapsuliranja kako bi se osigurala njihova učinkovitost i stabilnost. Svoju primjenu mikrokapsuliranje je pronašlo i u kontroli oksidativnih procesa, maskiranju okusa, maskiranju boja i uklanjanja neugodnih mirisa, osiguravajući odgođeni i kontrolirani učinak te produljujući rok valjanosti proizvoda.

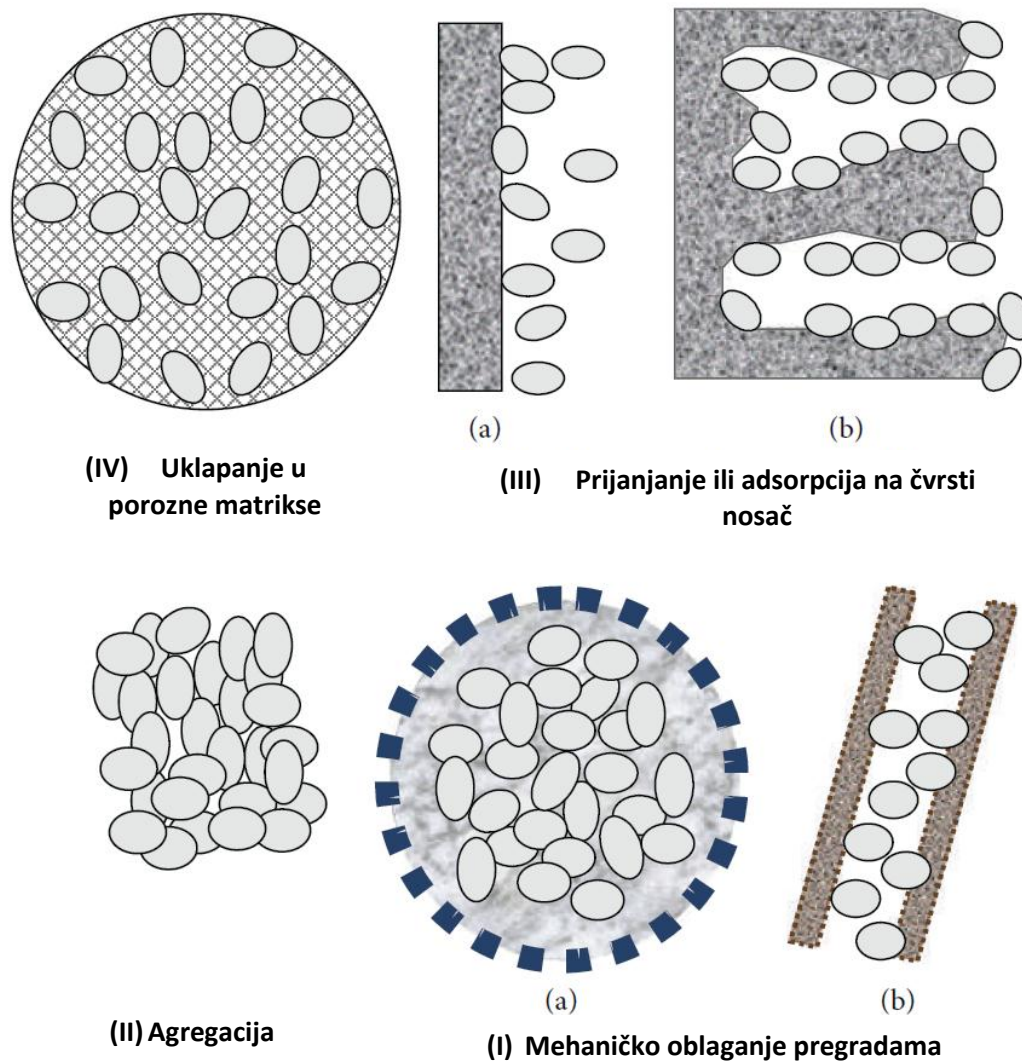
Kapsuliranje se definira kao fizikalno-kemijski ili mehanički proces koji uklapa jednu tvar u drugu tvar, proizvodeći čestice nanometarskih (nanokapsuliranje), mikrometarskih (mikrokapsuliranje) ili milimetarskih veličina [15]. Različite tehnike nude različite veličine i raspone veličina čestica dobivenih njihovom primjenom (slika 4.).



Slika 4. Razlike u veličini i rasponu veličina čestica dobivenih različitim tehnikama oblikovanja. (prilagođeno prema *Serna-Cock* i sur. 2013)

Mikrokapsulirana tvar se naziva čvrsta tvar, aktivni agent ili unutarnja faza. Tvar koja se koristi za mikrokapsuliranje (oblaganje) naziva se oblagajuća membrana, ovojnica, nosač, vanjska faza, ili matriks. Za posebnu tehniku oblaganja kao što je *freeze-drying* tehnologija, kao tvari za oblaganje (vanjska faza, matriks) koriste se krioprotektivne tvari. Mikrokapsuliranjem se želi postići stabilizacija živih stanica, povećati njihova stabilnost i preživljavanje tijekom proizvodnih procesa, skladištenja i korištenja. Postoje tri vrste mikrokapsula [15]: spremišni tip, matriksni tip i obloženi matriksni tip. Spremišni tip ima omotač oko inkapsulirane tvari (često zvan i kapsulom). Kod matriksnog tipa aktivna tvar je dispergirana u nosaču pa stoga može biti smještena i na površini matriksnog tipa.

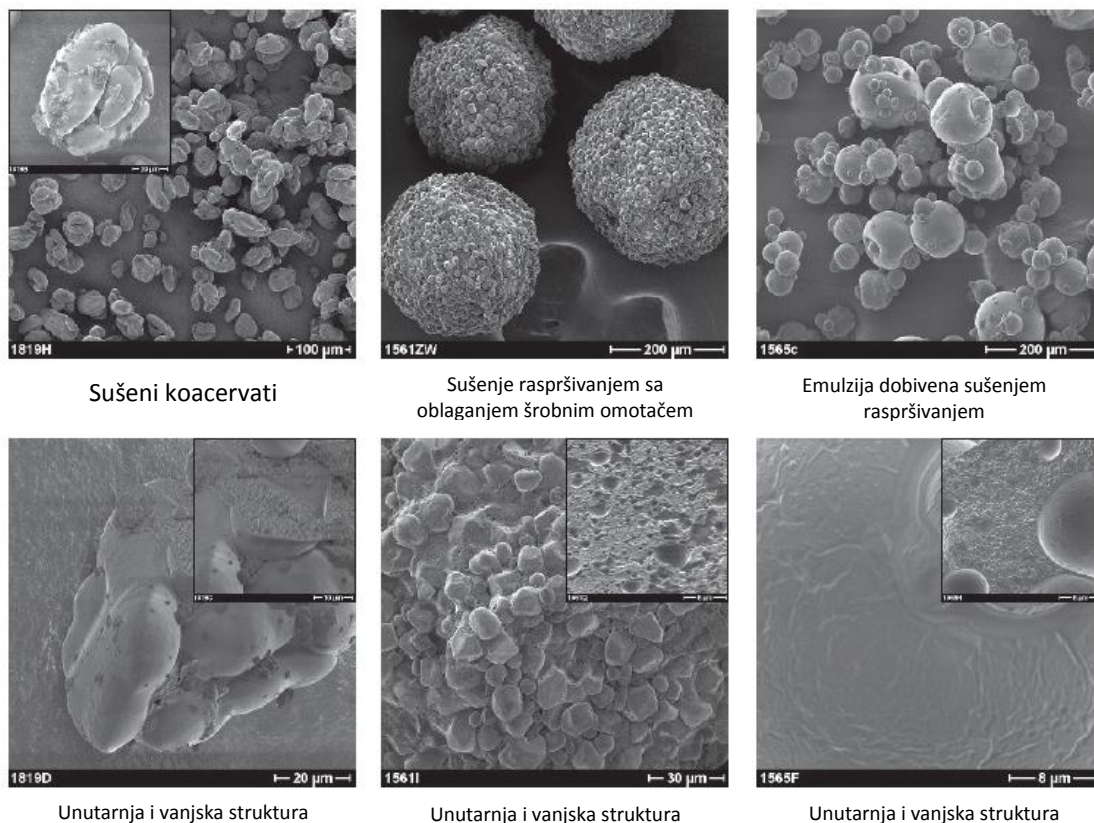
Kombinacijom prva dva navedena tipa dobivamo treći tip, obloženi matriksni tip u kojem nam je aktivna tvar kapsula obložena dodatnim slojem.



Slika 5. Različite tehnike oblikovanja probiotičkih mikroorganizama (Prilagođeno prema Mitropoulou i sur. 2013).

Odabir tehnologije mikrokapsuliranja vrlo je bitan. Uzimajući u obzir kako se radi o probioticima, živim organizmima, uvjeti tehnologije mikrokapsuliranja moraju biti dizajnirani tako da očuvaju žive mikroorganizme, a otapala i tvari korištene u mikrokapsuliranju ne smiju

biti toksične. Posebnu pozornost treba obratiti na uvijete otpuštanja imobiliziranih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu.



Slika 6. 3D prikaz različitih oblika čestica dobivenih različitim tehnikama (prilagođena prema Smith i sur. 2011)

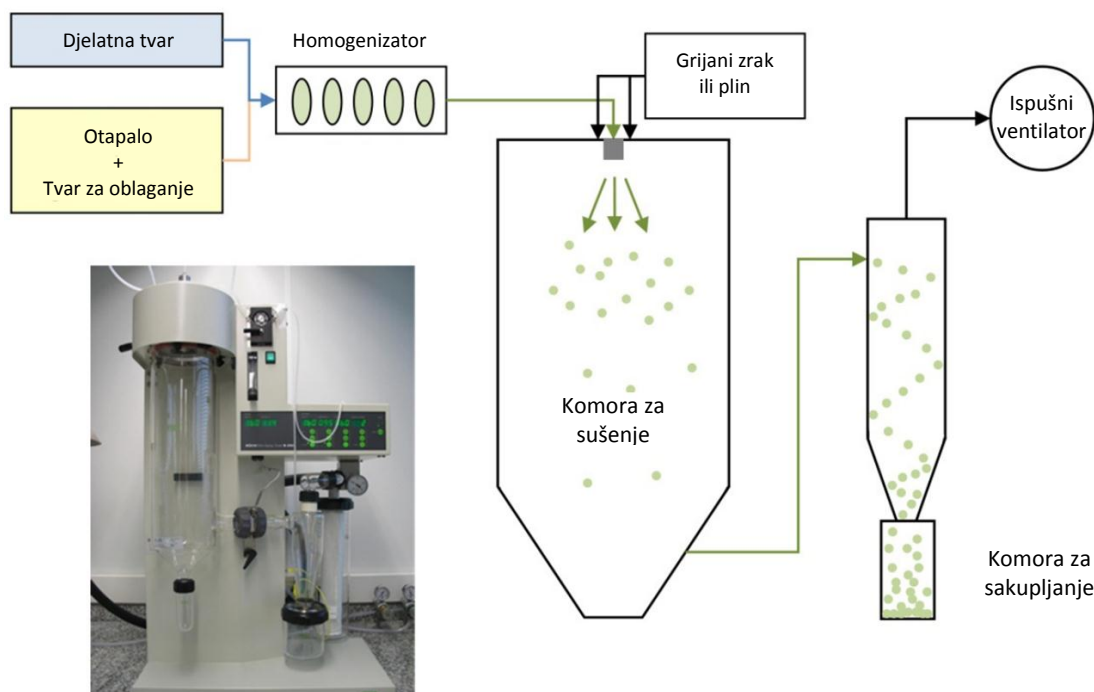
4.1.1. Sušenje raspršivanjem (*Spray-drying*)

Sušenje raspršivanjem je prikladna tehnika za industrijsku primjenu u proizvodnji velikih skala. Tekuća mješavina je atomizirana u kotlu korištenjem mlaznica ili diskova a otapalo isparava dolaskom u kontakt sa vrućim zrakom ili plinom [15]. Sušenje raspršivanjem se koristi kada se aktivna tvar otapa u sredstvu za inkapsuliranje tvoreći emulziju ili

suspenciju. Kao otapalo se koriste hidrokoloidi poput želatine, modificiranog škroba, dekstrin ili ne-gelirajući proteini. Otopina se suši stvarajući barijeru i štiteći bakterije od oksidativnih procesa i drugih agresivnih agensa [17].

Otopina koja sadrži probiotike i otopljeni polimerni matriks se najčešće priprema koristeći arapsku gumu i škrob jer oni imaju tendenciju stvaranja sfernih mikrokapsula tijekom procesa sušenja. Prilikom procesa sušenja dodajemo krioprotektivne tvari kako bismo zaštitili žive bakterije.

Parametri na koje treba obratiti pozornost: protok zraka (plina), vrsta i soj mikroorganizma te njegova kompatibilnost sa nosačem, materijal nosača (niska viskoznost, bez okusa, dobre topljivosti), temperatura sušenja (broj živih mikroorganizama pada s porastom temperature), vrijeme sušenja (treba biti što kraće), uvjeti čuvanja koji će osigurati preživljavanje mikroorganizama (nizak aktivitet vode, niže temperature skladištenja) [15].



Slika 7. Shematski prikaz sušenja raspršivanjem i fotografija uređaja Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI) (Prilagođeno prema Chávarri i sur. 2012)

4.1.2. Liofilizacija (*Freeze drying*)

Liofilizacija je proces u kojem se probiotici, zajedno sa materijalom nosača, zamrzavaju (najčešće na temperaturi između -30°C i -20°C), nakon čega slijedi vakuum sublimacija vode (najčešće na temperaturi između -50°C i -30°C).

U tehnici sušenja hlađenjem (*Freeze drying*) otapalo se zamrzne i uklanja postupkom sublimacije. Prilikom postupka smrzavanja nastaju oštećenja na stanicama zbog formiranja ledenih kristala i promjene u osmolarnosti. Napredak metode doraden je raspršivanjem, gdje otopina koja sadrži probiotike prolazi postupak atomizacije pomoću kriogene tekućine poput tekućeg dušika, gdje kao rezultat nastaju disperzije smrznutih kapljica koje se naknadno suše (sublimiraju) *Freeze dry* tehnikom [17].

Po završetku liofilizacije, liofilizatu se dodaju krioprotektivne tvari kako bi sačuvale i stabilizirale probiotičku aktivnost za vrijeme skladištenja. Najčešće krioprotektivne tvari su laktoza, trehaloza, sorbitol i sukroza. Liofilizirani probiotici imaju veću stabilnost pri skladištenju, naročito pri nižim temperaturama i uvjetima inertne atmosfere (atmosfera dušika ili vakuum prostor). Veliki nedostatak liofilizacije su troškovi koji su čak 4-7 puta veći od troškova sušenja raspršivanjem [15].

4.1.3. Hlađenje raspršivanjem (*Spray-cooling*)

Ovaj tehnološki postupak vrlo je sličan sušenju raspršivanjem u dijelu proizvodnje malenih kapljica. Razlika ove tehnike u odnosu na sušenje raspršivanjem je u nosaču i uvjetima provođenja tehnike. Princip ove tehnike i osnovna razlika u odnosu na sušenje

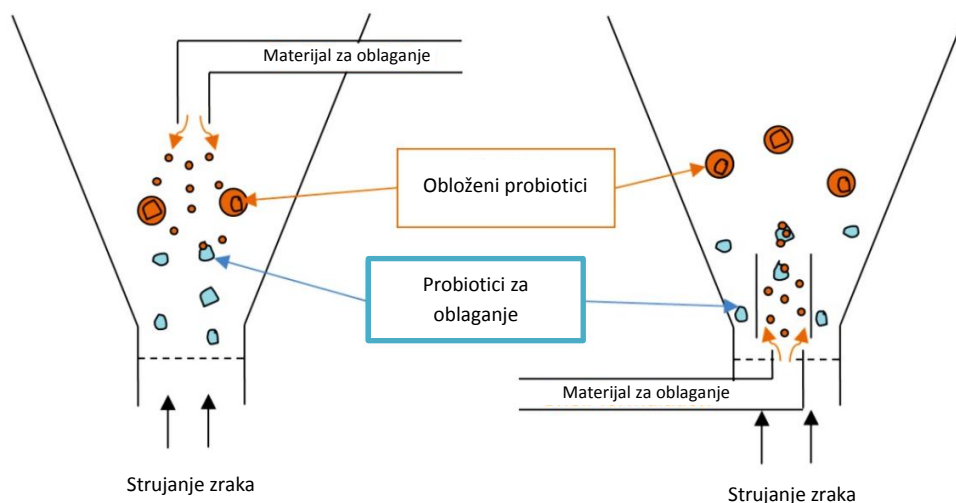
raspršivanjem je u odabiru nosača i njegovim fizikalnim karakteristikama. Odabrani matriks ima nisku točku taljenja i kao takav se dodaje mješavini probiotičkih bakterija te se zajedno puštaju kroz struju hladnog zraka kako bi omogućili trenutno stvrdnjavanje omotača.

Vrlo je zanimljivo kako kapsule proizvedene ovom tehnikom nisu topljive u vodi. Zbog termičkih zahtjeva, tehnika nije našla svoje mjesto pri odabiru tehnika za proizvodnju probiotika.

4.1.4. Fluid-bed aglomeracija i oblaganje u vrtložnom sloju

(Fluid-bed agglomeration and Fluid-bed coating)

Fluid-bed tehnologija se razvila iz niza inovativnih patenata tijekom 60-ih godina prošlog stoljeća. Ova tehnika se temelji na strujanju zraka pomoću kojeg se dobiva ujednačeno kruženje čestica preko atomizirajućih mlaznica. Mlaznice služe za atomiziranje odabranog materijala (u obliku otopine ili rastaljenom obliku) i za oblaganje probiotičkih bakterija, koji se stvrdne pri nižim temperaturama ili prilikom hlapljenja otapala. Pravilno kretanje čestica ključno je za postizanje jednakog oblaganja svih probiotičkih čestica. Najčešće korištene tehnike su prikazane na slici 8. [17].



Slika 8. Dvije izvedbe uređaja za fluid-bed aglomeraciju i oblaganje probiotika u vrtložnom sloju (Prilagođeno prema Chávarri i sur. 2012).

Mlaznice za raspršivanje mogu se postaviti s donje ili gornje strane uređaja. Kod postavljanja mlaznica s gornje strane oblaganje se odvija u smjeru suprotnom od strujanja zraka. Ova tehnika je korisna za aglomeraciju i granulaciju. Aglomeracijom čestice postaju teže i zadržavaju se u donjem dijelu uređaja a neaglomerirane čestice, budući da su lakše, uzdižu se prema vrhu dok ne stvore aglomerate koji se ponovno zadržavaju u nižim dijelovima i time postizemo uniformnost aglomerata.

Postavljanjem mlaznica s donje strane, u smjeru strujanja zraka, postiže se ujednačenost omotača na malim česticama i sprječava se njihova aglomeracija prilikom oblaganja.

Najčešće korišteni materijal za oblaganje probiotika ovom tehnikom su lipidi, no moguće je koristiti proteine ili ugljikohidrate.

4.1.5. Sušenje u vakuumu (*Vacuum-drying*)

Tehnika sušenja u vakuumu vrlo je slična tehnici liofilizacije, no ona se za razliku od liofilizacije provodi na temperaturi 0-40°C u trajanju od 30 minuta pa sve do nekoliko sati. Tijekom ove tehnike proizvod se ne smrzava te su time izbjegnute posljedice nastajanja oštećenja probiotika uslijed zamrzavanja. Sam postupak traje dulje zbog blažih uvjeta sušenja.

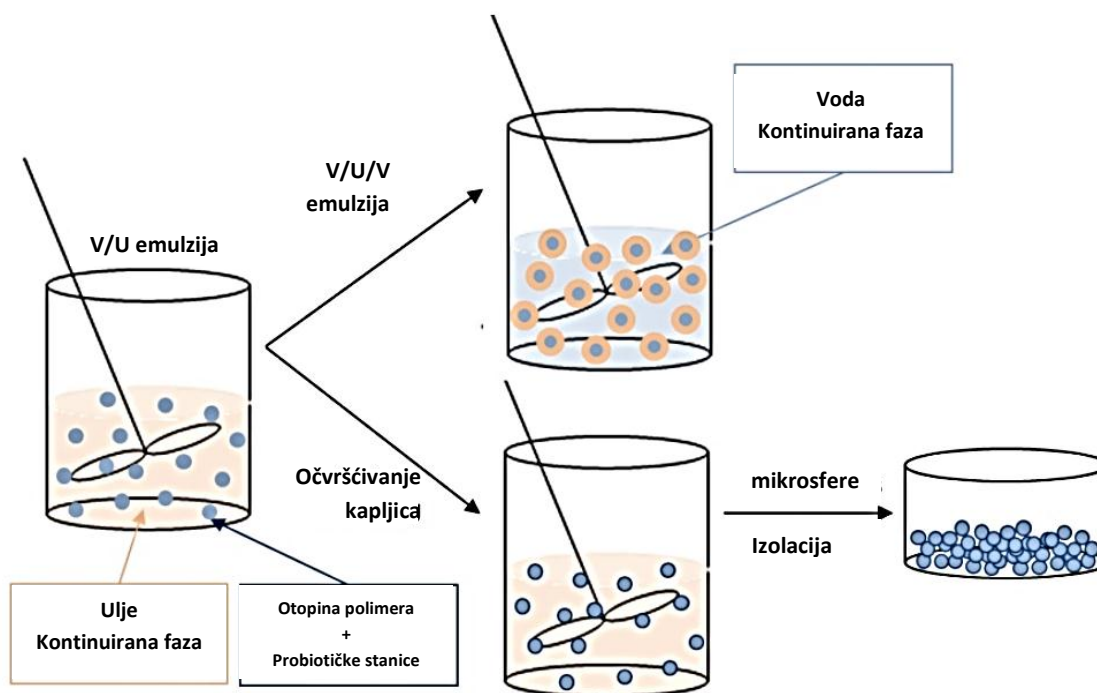
4.1.6. Metode na bazi emulzija (*Emulsion based techniques*)

Emulzifikacija je kemijska tehnika oblaganja probiotika uz korištenje hidrofilnih koloida (alginata, karagenana i pektina) kao obložnog materijala. Za tehniku su nam potrebni emulzifikator i surfaktanti. Kao faktor za učvršćivanje se dodaje kalcijev klorid (Ca^{2+} ioni).

Mali volumen suspenzije koja sadrži stanice probiotika i odgovarajući polimer dodaje se velikom volumenu uljne faze i miješanjem smjese dobivamo V/U emulziju [18]. Vrlo često za sniženje pH koristi se kiselina topiva u vodi (npr. octena kiselina), koja snižavanjem pH medija omogućava početak učvršćivanja pomoću Ca^{2+} . Ovom tehnikom dobivamo mikrosfere čiji je glavni nedostatak velika varijacija u veličini (25µm – 2mm) i obliku. Tehniku je lako uvećati na volumen industrijske proizvodnje (scale-up) i osigurati visoku stopu preživljavanja bakterija [19].

U nekim zemljama nije dopušteno koristiti karagenan ili gelan gumu u dodacima prehrani stoga se za oblaganje probiotika koriste proteini mlijeka. Nakon formiranja V/U emulzije u ovakvim slučajevima geliranje je inducirano enzimskom reakcijom. Proteini

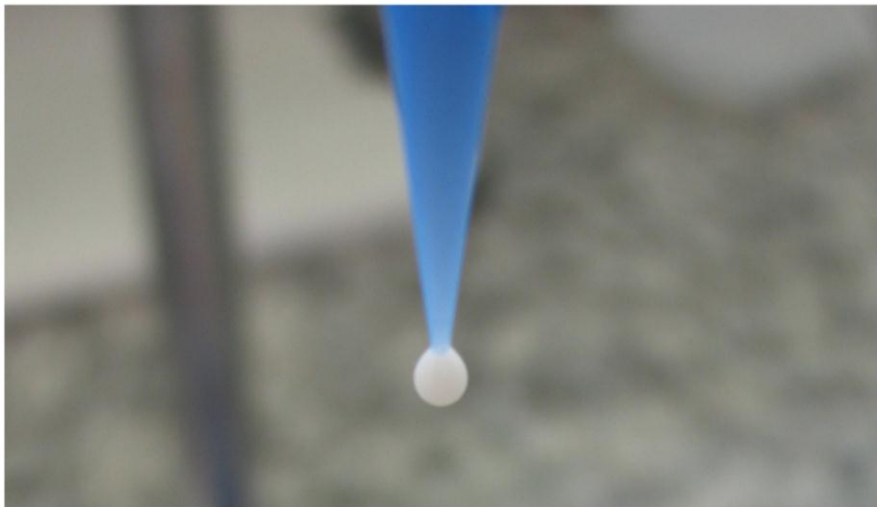
mlijeka imaju izvrsna gelirajuća svojstva i prirodni su nosač za probiotike. Ovom metodom dobivamo u vodi netopive i kuglaste čestice.



Slika 9. Oblaganje probiotika tehnikom dobivanja emulzije (Prilagođeno prema Chávarri i sur. 2012).

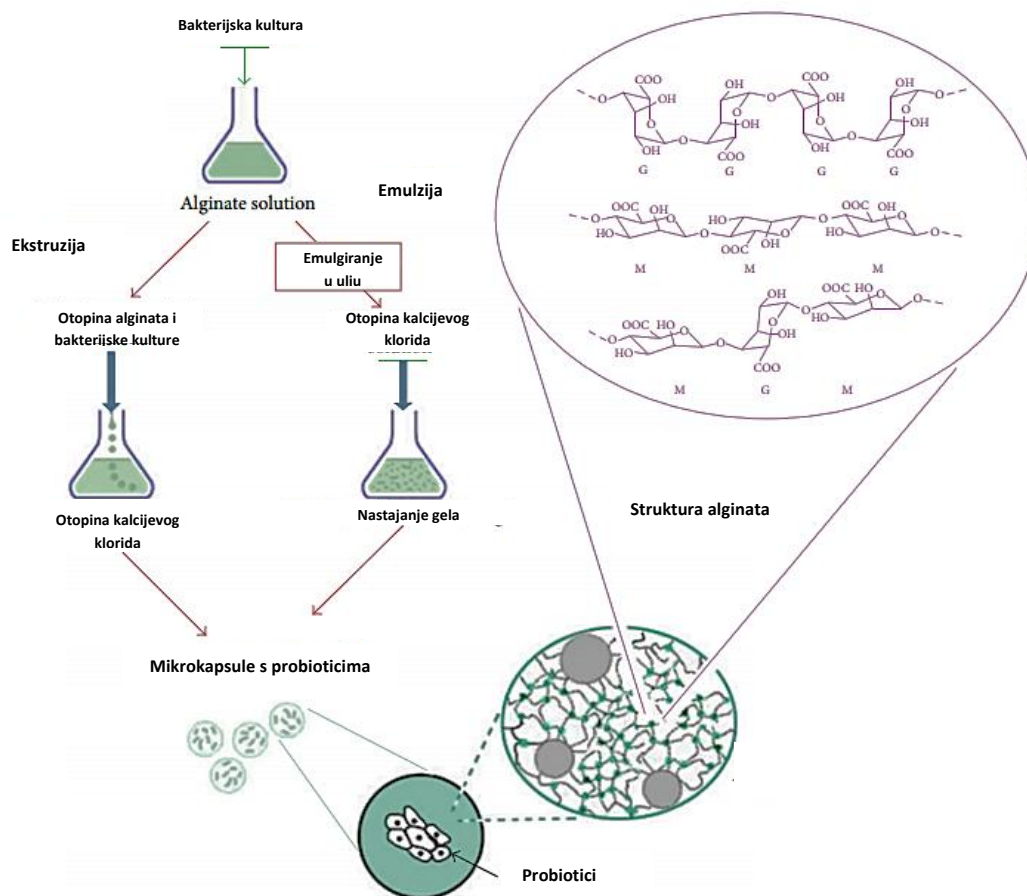
4.1.7. Ekstruzijska tehnika za mikrokapsuliranje u mikrosfere (*Extrusion techniques for the microencapsulation in microspheres*)

Jedna od najstarijih tehnika za oblikovanje probiotičkih formulacija. Priprema započinje dodavanjem probiotičkih bakterija u prethodno pripremljenu hidrokoloidnu otopinu kako bi nastala suspenzija. Suspenzija se protiskuje kroz špricu kako bi se lakše formirale kapi koje se direktno dodaju u otopinu za očvršćivanje koja sadrži Ca^{2+} (vidi poglavlje 4.1.6.).



Slika 10. Oblikovanje kapi pod djelovanjem gravitacije koristeći špricu otvora 160 μm .

Kada kapi dođu u kontakt sa otopinom za očvršćivanje, alginatni polimeri okružuju površinu kako bi formirali mrežastu strukturu pomoću Ca^{2+} . Korištenjem alginata niskog stupnja glukuronizacije možemo dobiti čestice manjeg promjera. Ukoliko želimo oblagati kitozanom, otopinu alginata dodajemo otopini kitozana i Ca^{2+} iona [20].



Slika 11. Usporedba tehnike ekstruzije i dobivanja emulzije u oblaganju probiotika (Prilagođeno prema Nedovic i sur. 2011).

4.1.8. Adhezija na škrobne granule

Jedinstvenost škroba pred ostalim ugljikohidratima je njegova pojavnost u česticama, odnosno granulama. Veličina granula ovisi o izvoru samog škroba te može biti od 1 do 100 μm . škrobni hidrolizati i modificirani oblici škroba pogodni su za korištenje u mikrokapsuliranju. Od svih vrsta, najpogodniji je kukuruzni škrob koji modificiran amilazama postaje izvrstan nosač za probiotičke bakterije.

4.1.9. Oblaganje kompresijom

Tehnika oblaganja kompresijom uključuje kompresiju praškaste forme probiotičkih kultura u čvrstu tabletu ili pelete, te u konačnici oblaganje cijelog oblika kompresijom gel-formirajućeg obložnog materijala. Zbog veličine gotovog oblika i samog postupka, tehnika je češće prepoznata u farmaceutskoj industriji u odnosu na prehrambenu industriju.

4.2. IZAZOVI U RAZVOJU FORMULACIJA

Razvijeno je mnogo sustava za dostavu probiotika na mjesto djelovanja i u njih ubrajamo konvencionalne farmaceutske oblike i ne-konvencionalne komercijalne proizvode. Konvencionalni farmaceutski oblici su puno učinkovitiji od ne-konvencionalnih komercijalno dostupnih proizvoda. Među tim formulacijama također postoji raznolikost u učinkovitosti i sposobnosti dostave živih bakterija na mjesto djelovanja. Sam proces formulacije značajno utječe na sposobnost preživljavanja probiotika i kvantitativnu učinkovitost formulacije. Poznavanjem potencijalnih problema pri razvoju formulacija, omogućuju optimizacije i nakon procesa formulacije a ispitivanja se provode *in vitro* i *in vivo* modelima.

Većina novih farmaceutskih oblika nadilazi probleme i osigurava nam učinkovit sustav za dostavu probiotika i uspostavljanja učinka na pacijenta. Izazovi u razvoju formulacija uključuju rješavanje nedostatne zaštite probiotika prilikom prolaska kroz agresivne uvjete u probavnom sustavu, dostavu nedovoljnog broja živih bakterija na mjesto djelovanja, dostavu pogrešnih vrsta i sojeva probiotika za određena stanja i malu zaštitu prilikom uzimanja sa antibioticima.

Studije su pokazale da je potrebno barem $10^8 - 10^9$ živih stanica (CFU)¹ po gramu crijevnog sadržaja dostaviti u crijevo probavnog sustava kako bi se postigao zdravstveni učinak na pacijenta [21]. Mnoge formulacije sadrže upravo one probiotičke sojeve koji su pokazali veću otpornost na niži pH, primjerice pripadnici roda *Lactobacillus* (LAB), u odnosu na *Bifidobacterium*. Otpornost na žučne soli jedan je od zahtjeva probiotika koje želimo koristiti u formulaciji. Probiotičke bakterije koje su stalni članovi naše mikroflore, već su

¹ CFU – Colony Forming Units

stekle otpornost na žučne soli [21] te njihovom izolacijom i karakterizacijom dobivamo adekvatnu probiotičku bakteriju za ciljanu dostavu u probavni sustav.

Trenutno postoje različite formulacije koje su namijenjene za određenu svrhu i one uključuju fermentirano mlijeko, žvakače gume, tablete za žvakanje, sašete, kapsule, tablete i suspenzije. Većina formulacija dizajnirana je za oralni put primjene obzirom da je ciljno mjesto crijevna mikroflora [22].

Vrijednost pH želučanog soka za vrijeme hranjenja, jedan je od prvih izazova s kojima se susreću probiotici primijenjeni oralnim putem. Sposobnost formulacije i samih probiotika da toleriraju probavne stresne uvjete jedan je od glavnih izazova, nadalje tu je i sposobnost tolerancije topline, osmotskog i oksidativnog stresa. S tehnološke strane glavni zadatak razvoja je zadržati preživljavanje probiotičkih bakterija prilikom proizvodnje i roka valjanosti formulacije [23].

Tablica 5. Tehnološka svojstva koja moraju zadovoljiti probiotički pripravci

Tolerancija na kisik

Tolerancija na kiselinu

Tolerancija na žučne soli

Tolerancija na toplotu

Sposobnost metabolizma prebiotika

Formulacije moraju sadržavati probiotičke sojeve koji imaju GRAS (Generally Regarded As Safe) status. Formulacije koje sadrže više sojeva ili više rodova probiotika ponekad imaju bolji učinak nego formulacije koje sadrže samo jednu vrstu/soj. Posebno treba obratiti pozornost na međusobni inhibitorski učinak probiotika, npr. proizvodnja H₂O₂, bakteriocina ili bakteriocinu sličnih supstanci.

Prema novijim saznanjima svaka vrsta/soj specifična je po svom djelovanju i postiže specifični učinak na određeno stanje u odnosu na ostale vrste. Upravo zbog toga budućnost probiotika je definiranje pojedinih vrsta/sojeva za točno određena stanja pa s tehnološke strane omogućiti i veću količinu (CFU/g) na ciljano mjesto radi bolje učinkovitosti same terapije.

4.2.1. Nizak pH želučanog soka

Želučani sok može doseći pH vrijednosti do 1,5, što je vrlo nisko i treba osigurati preživljavanje mikroorganizama u kiselom okruženju. Primjer nepovoljnog učinka niskog pH na preživljavanje probiotičkih bakterija dali su istraživači Hood i Zottola [24] koji su u svom izvješću dali informaciju kako je *Lactobacillus acidophilus*, koji je inače tolerantan na niži pH, skroz izgubio mogućnost preživljavanja nakon 45 min u mediju pH 2.0 dok u mediju pH 4.0 nije bilo statistički značajne promjene u koncentraciji nakon 2 sata.

Rješenje ovog problema je korištenje polimera za oblaganje koji na sebi imaju karboksilne skupine koje slabo disociraju pri niskom pH kakav se nalazi u želucu, ali

ioniziraju i odlično se otapaju pri neutralnom pH. Primjer takvog polimera je hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) [25].

4.2.2. Zaštita probiotika odabirom odgovarajućih ekscipijensa

U farmaceutici se pronašlo rješenje kako lijekove i aktivne tvari koji su osjetljivi na kiseli medij neoštećene dostaviti na ciljano mjesto. Tablete i kapsule se dizajniraju tako da kontroliraju oslobađanje i adheziju te pomažu kolonizaciju probiotika na mukozi crijeva odabirom odgovarajućih ekscipijensa. Znanstvenik Klayraunga i suradnici razvili su tabletu koja štiti probiotike prilikom prolaska kroz želudac i nizak pH te ih dostavlja u crijeva u živom obliku. Za formiranje matriksa takve tablete koristili su hidroksipropil metilceluloza ftalat (HPMCP) jer je taj polimer netopiv pri uvjetima $\text{pH} \sim 1.5$, kakvi vladaju u želucu, ali je brzo topiv u tankome crijevu kad pH vrijednost poraste na ~ 5.5 . Kombinacija hidroksipropilceluloze i hidrofilnog polimera alginata osigurava specifična gelirajuća svojstva i dodatnu zaštitu probiotika u formulaciji [22].

Karboksimetil amilozni škrob (CM-HAS) kao ekscipijens za dostavu bioaktivnih tvari nije se pokazao idealnim rješenjem za dostavu tih tvari u kolon jer je podložan enzimskoj hidrolizi alfa-amilaze. Kombinacija kitozana sa CM-HAS činila se dobrim rješenjem jer kitozan zadržava stabilnost na enzimsku razgradnju u dvanaesniku i tankome crijevu ali ga razgrade enzimi bakterija u kolonu. Problem je nastao jer je kitozan topiv u kiselom želučanom mediju uslijed protoniranja amino skupina. U konačnici se došlo do novog rješenja sa dvostrukim slojem: CM-HAS:kitozan tablete obložene dodatnim slojem CM-HAS polimera. Na taj način vanjski sloj CM-HAS polimera zaštititi će kitozan prilikom prolaska kroz medij želuca. Dolaskom u tanko crijevo vanjski sloj razgraditi će alfa-amilaze, a

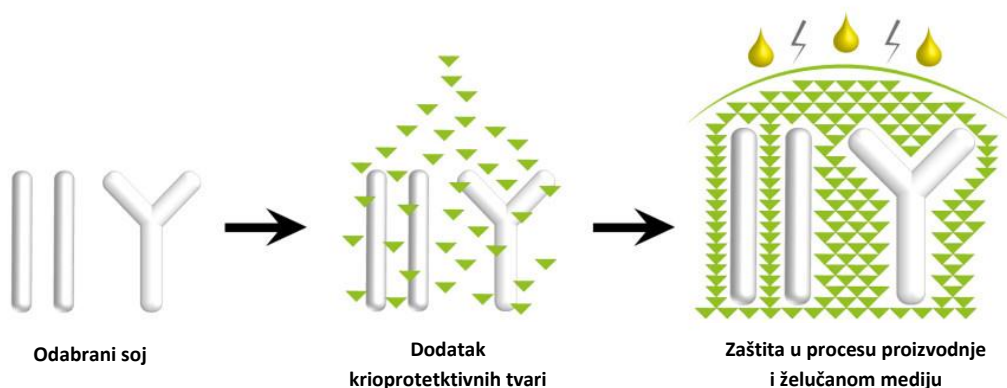
unutarnji sloj CM-HAS:kitozan biti će zaštićen zahvaljujući kitozanu te će taj sloj biti razgrađen u kolonu djelovanjem enzima bakterija mikroflore kolona.

4.2.3. Patentirane tehnologije dostave probiotika

"PROBIO-TECH" tehnike uključuju oblaganje bakterijskih kultura polisaharidima kako bi ih zaštitili prilikom proizvodnje i prolaska kroz želudac. LIVEBAC tehnologija razvijena je u kompaniji Nutraceutix i osigurava zaštitu probiotika produljujući rok valjanosti čuvanjem izvan hladnjaka.

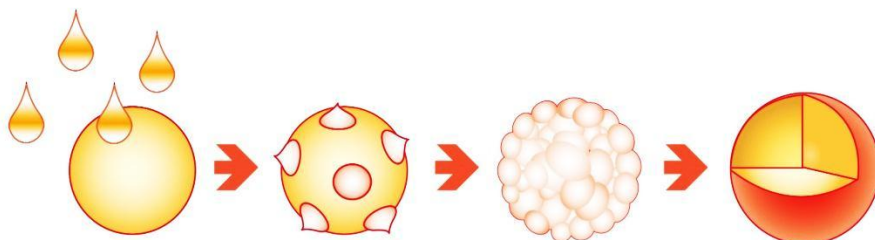
Lallemand Health Solutions razvio je program zaštite probiotičke formulacije na 3 razine i garantira otpornost na želučani medij te osigurava oslobađanje probiotika u crijevu prilikom promjene pH. [22]

Prva razina je BIO-SUPPORT™ strain technology; uključuje odabir optimalnog soja sa prirodnom rezistencijom na želučanu kiselost i odabir odgovarajućeg matriksa koji će se primijeniti tijekom liofilizacije.



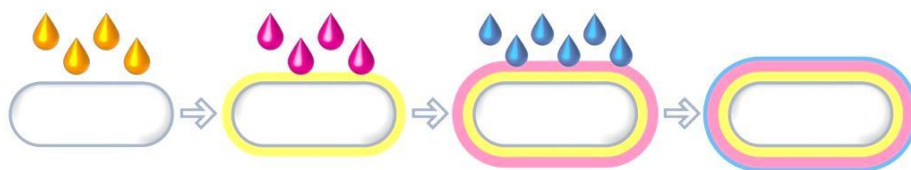
Slika 12. BIO-SUPPORT™ strain technology (prilagođeno prema Lallemand Health Solutions; <http://www.lallemand-health-solutions.com/manufacturing/technologies/>, pristupljeno 30-10-2015)

Druga razina je Pobiocap®; patentirana tehnologija mikrokapsuliranja, idealna za procese s agresivnim uvjetima i svestrane formulacije.



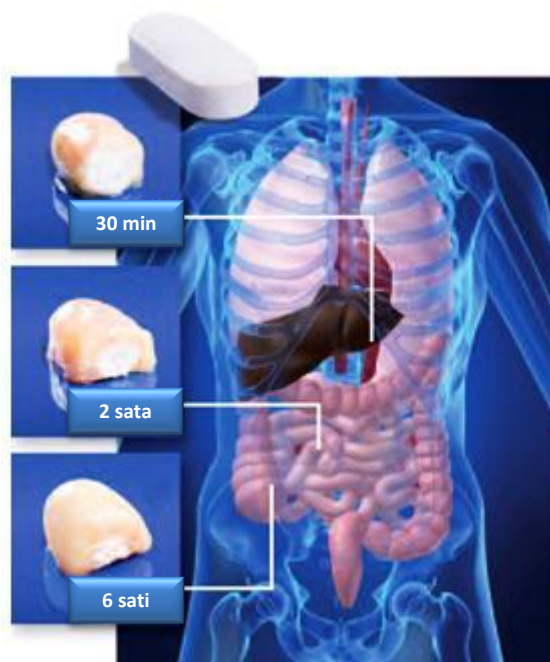
Slika 13. Pobiocap® (prilagođeno prema Lallemand Health Solutions; <http://www.lallemand-health-solutions.com/manufacturing/technologies/>, pristupljeno 30-10-2015)

Treća razina je Star® tehnologija; patentirana tehnologija, nagradom nagrađena tehnologija za formiranje kapsule, osiguravajući optimalnu i ciljanu dostavu u probavni sustav za sve probiotičke sojeve.



Slika 14. Star® tehnologija (prilagođeno prema Lallemand Health Solutions; <http://www.lallemand-health-solutions.com/manufacturing/technologies/>, pristupljeno 30-10-2015)

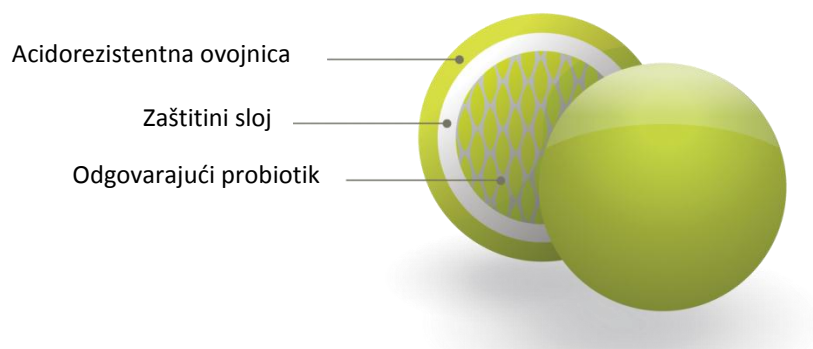
Tehnologija kontrolirane dostave (CDT) uključuje proizvodnju tableta i kapsula koje su "programirane" za oslobađanje aktivnog sastojka konstantnom brzinom, pulsirajući ili u točno određenom vremenskom intervalu. BIO-tract® je patentirana CDT gdje *L.acidophilus* može biti dostavljen u tanko crijevo, a *Bifidobacterium spp.* je ciljano dostavljena u kolon [22].



Slika 15. BIO-tract® tehnologija (prilagođeno prema Yadav Nisha R i sur, 2013).

Kada je tableta ovlažena želučanim sokom, gelirajući matriks stvara zaštitni sloj oko probiotika i odgađa njihovo oslobađanje iz oblika. Dolaskom u tanko crijevo bakterije se počinju otpuštati konstantnom brzinom iz tablete, osiguravajući odgovarajuće količine tokom cijelog dana i duž probavnog sustava. Ovo je jedina tehnologija kontroliranog otpuštanja dostupna na tržištu.

Qore™ Probiotic koristi tehnologiju Trisphere™, troslojne granule za dostavu probiotika u crijevo [22].



Slika 16. Qore™ Probiotic s tehnologijom Trisphere™ (prilagođeno prema Yadav Nisha R i sur, 2013)

Na području vaginalne primjene razvijene su vaginalne tablete koje se sastoje od dva sloja koja sadrže različite komponente. Jedan sloj je formuliran tehnologijom trenutnog oslobađanja (IR) a drugi osigurava sporo produženo oslobađanje (PR). Hidroksipropil metilceluloza je korištena kao bioadhezivni agens za postizanje produženog učinka oslobađanja *Lactobacillus*. Karbopol se nije pokazao toliko dobrim bioadhezivnim agensom jer je smanjivao adheziju laktobacila na vaginalnu sluznicu [22].

Znanstvenik Pliszczak i suradnici trenutno rade na novom vaginalnom obliku čiji se bioadhezivni sustav temelji na kombinaciji pektina i hijaluronske kiseline u tvorbi mikročestica za kapsuliranje probiotika i prebiotika [22].

Odabirom i istraživanjem inovativnih ekscipijensa možemo unaprijediti farmaceutske oblike probiotika. Istraživanje ekscipijensa je izuzetno bitno jer su to tvari koje dolaze u direktan kontakt sa probioticima te je bitno da nisu higroskopni, da sadrže što manji udio vode. Velika prednost ekscipijensa je ako se on može koristiti kao prebiotik. Najveći postotak ekscipijensa se koristi za mikrokapsuliranje probiotika ili za izradu matriksa tablete prilikom formuliranja.

4.3. OBLICI ZA ORALNU PRIMJENU

4.3.1. Primjena u usnoj šupljini

Ljudska usta mjesto su na kojem nalazimo različite vrste mikroorganizama kao što su virusi, gljivice, bakterije i protozoe. Bakterije prisutne u usnoj šupljini mogu uzrokovati dentalni karijes i bolesti desni. Jednako kao što u probavnom traktu vlada ravnoteža između dobrih i loših bakterija, ista je situacija i u usnoj šupljini. Ta ravnoteža može biti lako narušena, pogotovo jer se radi o usnoj šupljini u koju unosimo različite tvari (mnoštvo mikroorganizama, mediji različitih pH vrijednosti, toksini, potencijalno bakteriocidni spojevi). Narušavanjem ravnoteže dolazi do problema povezanih sa oralnim zdravljem kao što su dentalni karijes, periodontitis (upala desni), zadah iz usta. [26]

Utjecaj probiotika na održavanje uravnotežene oralne mikroflore pokazao se učinkovitom metodom za održavanje oralnog zdravlja, iako u nešto manjoj mjeri za periodontitis (upalu desni) u odnosu na dentalni karijes. Probiotici na tržištu, namijenjeni održavanju oralnog zdravlja, sadrže rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te vrstu *Streptococcus salivarius* K12. Mnoge studije su pokazale kako spomenute probiotičke vrste smanjuju oralne koncentracije kariogene bakterije *Streptococcus mutans*, proizvode bakteriocine protiv *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumonia* i samim time preveniraju rekurentni faringitis, otitis mediu i tonzilitis [26].

Najprikladniji oblik za dostavu probiotika u usnu šupljinu su oralne suspenzije ili čvrsti oblici koji omogućuju oslobađanje probiotika u usnoj šupljini.

4.3.2. Ciljana dostava u GIT-u

Na osnovi fiziologije probavnog sustava, različitog vremena prolaska, različitih pH vrijednosti pojedinih dijelova probavnog sustava, razvijeni su različiti farmaceutski oblici. Najveći udio probiotičkih proizvoda na tržištu namijenjen je upravo primjeni u kolonu.

Različite vrijednosti pH u probavnom traktu iskorištene su kao alat za ciljanu dostavu u kolon gdje se pH sadržaja kreće oko blago kiselog – neutralnog. Ciljana dostava omogućena je na osnovi topljivosti ekscipijensa kako je opisano u poglavlju 4.2.1.

Put pripravka nakon oralne primjene pa sve do kolona je vremenski zahtjevan te su zbog toga razvijeni oblici sa odgođenim oslobađanjem sadržaja. Mehanizmi oslobađanja su različiti, od osmoze, erozije omotača i difuzije iz polimera. Točnu lokaciju teško je odrediti jer ovisi o različitim stanjima u probavnom traktu.

4.3.3. Suhi oralni oblici

Suhi oralni oblici probiotičkih proizvoda uključuju tablete, kapsule i praške. Prikladan oblik određuje se prema ciljanoj populaciji pacijenata kao i svojstvima same formulacije koja sadrži probiotike. Za djecu i starije od 65 godina prikladniji su praškasti oblici radi lakšeg gutanja i adherencije pacijenata.

Često se postavlja pitanje stabilnosti praškastih oblika probiotika koji nezaštićeni moraju proći kroz agresivni sadržaj želuca. U farmaceutskoj industriji, praškasti oblici su namijenjeni prvenstveno za pedijatrijsku primjenu, imajući na umu kako je pH vrijednost želučanog sadržaja novorođenčeta neutralna, čak blago alkalna (vrijednost pH se približava

vrijednosti odraslih kroz 3-7 godina), ne moramo brinuti o niskom pH koji može smanjiti broj živih probiotičkih bakterija koje dostavljamo u crijevo.

4.3.4. Suspenzije

Suspenzije su klasificirane kao jedne od najizazovnijih farmaceutskih formulacija. To su najčešće grubodisperzijski sustavi u kojima disperznu fazu čini čvrsta tvar koja je suspendirana u tekućem disperznom sredstvu. Čvrsta tvar u suspenzijama je potpuno ili djelomično netopljiva u disperznom sredstvu. Kao takvi, najprikladniji su za pedijatrijsku i gerijatrisku populaciju koja često ima problema sa gutanjem suhih oralnih oblika poput kapsula ili tableta.

Suspenzije su također prikladne za lokalnu dostavu, primjerice dostavu probiotika u usnu šupljinu (pomoću kapalice).

4.4. OBLICI ZA VAGINALNU PRIMJENU

Proizvodi za vaginalnu primjenu dolaze u obliku kapsula za vaginalnu primjenu, vaginalnih tableta i vaginalnih supozitorija.

Dominantna mikroflora u vaginalnoj šupljini sačinjena je od *Laktobacillus* vrsta. Njihovim smanjenjem i prevalencijom aerobnih bakterija poput *Gardnerelle vaginalis*, *Bacteroides*, *Prevotella* i *Mobiluncus* vrsta, dolazi do pojave vaginoze [26].

Prednosti vaginalnog puta dostave je zaobilazanje prolaska kroz želudac gdje su nepovoljni uvjeti, kao i zaobilazeći lučenje enzima gušterače i žučnih soli. Ono što je ključno jest osigurati jednaku raspodjelu probiotika po vaginalnoj sluznici nakon primjene i desintegracije farmaceutskog oblika jer njihova adhezija na sluznicu je osnovni preduvjet za njihovo zadržavanje, rast i širenje, a samim time i terapijski učinak.

4.5. TOPIKALNA PRIMJENA PROBIOTIKA

Topikalna primjena probiotika bliska je budućnost koja obećava dobre rezultate. Dokaz o tome su nam dva prijavljena patenta: *Probiotic bacteria for the topical treatment of skin disorders* WO 2012150269 A1, i *Topical use of probiotic bacillus spores to prevent or control microbial infections* EP 0975227 A1 (WO1998047374A1). Veliki potencijal pokazali su za primjenu kod pojave ulcera kod dijabetičkog stopala [27]. Hipoteza se temelji na dokazanom probiotičkom i anti-infektivnom učinku kod terapije ulceroznih lezija na želucu.

4.5.1. *Probiotic bacteria for the topical treatment of skin disorders*

Sadržaj patenta odnosi se na probiotičke bakterije i/ili topljive metabolite probiotičkih bakterija i/ili stanične lizat probiotičkih bakterija za primjenu kod poremećaja vezanih sa međustaničnim čvrstim vezama (tzv. tight junction function), u formulaciji pripremljenoj za topikalnu primjenu [28].

Tvrdnje [28]:

1. Probiotičke bakterije i/ili topljivi metaboliti probiotičkih bakterija i/ili stanični lizat probiotičkih bakterija namijenjeni su za primjenu kod poremećaja vezanih sa međustaničnim čvrstim vezama (tzv. tight junction function), u formulaciji pripremljenoj za topikalnu primjenu.
2. Probiotičke bakterije i/ili topljivi metaboliti probiotičkih bakterija i/ili stanični lizat probiotičkih bakterija prema navodu u tvrdnji 1. uključeni su u formulaciju koja se nanosi na kožu.

3. Probiotičke bakterije i/ili topljivi metaboliti probiotičkih bakterija i/ili stanični lizat probiotičkih bakterija prema navodu u tvrdnji 1. formulirani su za primjenu na mukoznu membranu, gdje se pojam mukozne membrane odnosi na mukoza: vagine, penisa, mjehura, anusa, usta, nosa, grla, bronha, pluća, oka i uha

4. Probiotičke bakterije i/ili topljivi metaboliti probiotičkih bakterija i/ili stanični lizat probiotičkih bakterija prema navodu u tvrdnjama 1-3, mogu biti dio formulacija koje se sastoje od više različitih vrsta probiotičkih bakterija i/ili topljivih metabolita probiotičkih bakterija i/ili staničnih lizata probiotičkih bakterija.

5. Probiotičke bakterije i/ili topljivi metaboliti probiotičkih bakterija i/ili stanični lizat probiotičkih bakterija prema navodu u tvrdnjama 1-4, gdje se pojam bakterije odnosi na barem jednu vrstu bakterija mliječne kiseline.

4.5.2. *Topical use of probiotic bacillus spores to prevent or control microbial infections*

Spomenuti patent odnosi se na sastav koji uključuje izolirane *Bacillus* vrste, spore ili izvanstanične produkte bakterije *Bacillus coagulans* prikladne za topikalnu primjenu, za inhibiciju rasta kvasaca, gljivica, bakterija ili Herpes simplex virusa [29].

Tvrdnje [29]:

1. Sastav koji sadrži *Bacillus* vrste u farmaceutski prihvatljivom nosaču mora biti prikladan za za topikalnu primjenu na kožu ili mukoza sisavaca.
2. Sastav spomenut u tvrdnji 1. sadrži *Bacillus* vrste u formi spora.
3. Sastav spomenut u tvrdnji 1. sadrži *Bacillus* vrste u formi sušene stanične mase.

4. Sastav spomenut u tvrdnji 1. sadrži *Bacillus* vrste: *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus* i *Bacillus laevolacticus*.
5. Sastav spomenut u tvrdnji 1. sadrži 103 – 1012 živih bakterija ili spora po gramu sastava.

4.6. CJEPIVA U PROBIOTIČKIM NOSAČIMA

Zadnjih nekoliko godina, intenzivno se razvijaju nove strategije razvoja cjepiva kako bi se izbjegli nedostaci parenteralne primjene. Obzirom da sam mehanizam virusa, bakterija i ostalih patogena započinje njihovim prolaskom kroz mukozni sloj, oralni put primjene mogao bi stimulirati prirodni proces imunološke reakcije (infekcije) i postati vrlo učinkovita metoda imunizacije.

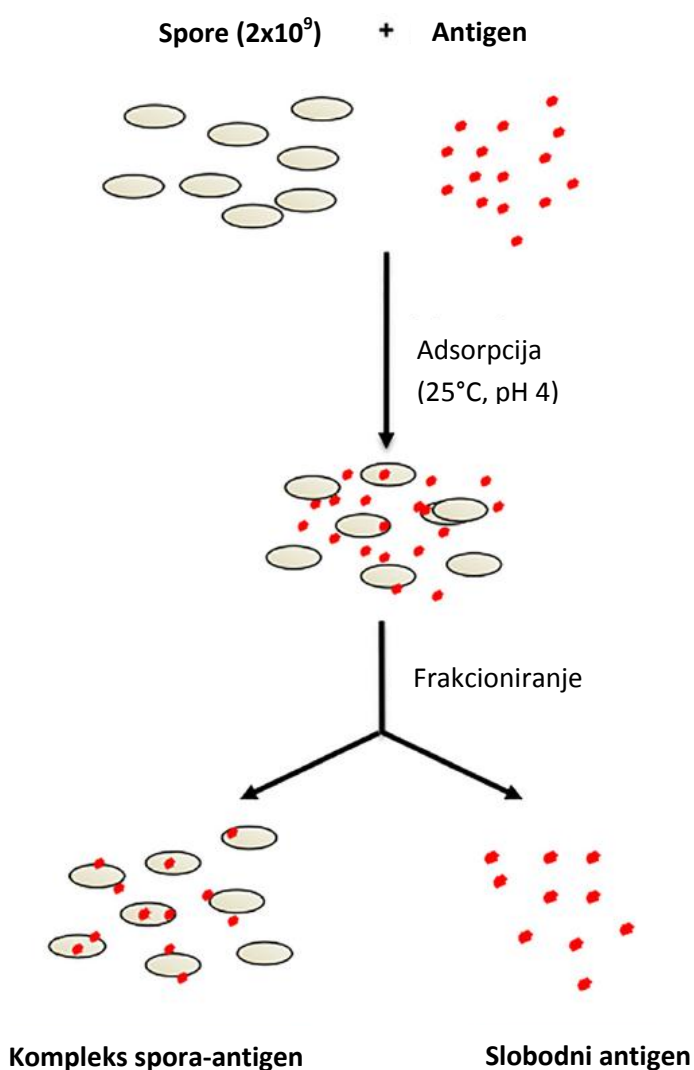
Svojstva laktobacila čine ih idealnim kandidatima za razvoj oralnih oblika cjepiva. Posebno zanimljivima su se pokazali sojevi koji imaju mogućnost pospješivanja antigen specifične imunološke reakcije kada su primijenjeni u kombinaciji s antigenom. Nekoliko terapijskih sustava predstavljeno je koristeći upravi laktobacile kao nosače za ekspresiju stranih antigena u obliku koji može biti predstavljen humanom imunološkom sustavu a samim time i biti aktiviran predstavljenim antigenom. Studija rađena na mišjem modelu je pokazala da se, nakon oralne primjene, mukozni i sistemski imunološki odgovor postiže protiv tetanus toksin fragmenta C proizvedenog intracelularno u laktobacilu [30].

Novija ispitivanja predlažu korištenje nerekombinantnih spora *Bacillus subtilis* bakterije kao sustav za imunizaciju preko mukoznog sloja. Spore *B.subtilis* ekstremno su otporne i stabilne, lake za manipuliranje i poznatog mehanizma djelovanja prema imunološkom sustavu, inducirajući zaštitni antigen-specifični odgovor. Rekombinantne modifikacije nisu poželjne na ovakvim modelima, naročito zbog njihovog nepoznatog djelovanja na ljude i životinje i njihovog mogućeg puštanja u okoliš [31].

Korištenje spora *B.subtilis* (rekombinantnih i nerekombinantnih) pokazuje prednost nad ostalim staničnim ili fago-specifičnim sustavima. Prednosti su: sigurnost spora *B.subtilis* za primjenu kod ljudi (isključivo nerekombinantnih), stabilnost spora, proteini koji se

adsorbiraju na spore su stabilizirani i zaštićeni interakcijom sa sporom i mnogo su stabilniji od slobodnih proteina pri višim temperaturama i nižim pH uvjetima[31].

Strategija za nerekombinantne spore temelji se na adsorpciji antigena na površinu spore pri temperaturi od 25°C u kiselom puferu (pH 4.0). Nakon adsorpcije spore sa vezanim antigenom odvajaju se od nevezanog antigena centrifugiranjem (slika 17.) [31].



Slika 17. Strategija vezanja antigena na nerekombinantne spore *B.subtilis* (Prilagođeno prema Ricca i sur. 2014)

4.7. PROIZVODI NA TRŽIŠTU HRVATSKE

Probiotici na tržištu Republike Hrvatske (dalje u tekstu RH) dolaze u obliku hrane, dodataka prehrani i lijekova. Kao glavni sastojci hrane i dodataka prehrani spadaju pod nadležnost Zakona o hrani (Narodne novine, br. 81/13), dok probiotici registrirani kao bezreceptni lijekovi (OTC) spadaju pod Zakon o lijekovima (Narodne novine, br. 76/13) i moraju zadovoljiti navedene zahtjeve.

4.7.1. Postupak stavljanja na tržište

Dodatak prehrani

Postupak stavljanja dodatka prehrani na tržište može ići u dva smjera:

a) Obavijest Ministarstvu zdravlja o stavljanju dodatka prehrani na tržište

Kada proizvod sadrži vitamine/minerale čiji su kemijski oblici sukladni Pravilniku o dodacima prehrani i čiji preporučeni dnevni unos ne prelazi najveći dozvoljeni dnevni unos sukladno Prilogu IV. Pravilnika o dodacima prehrani.

Kada proizvod sadrži druge tvari, gljive, biljne vrste i probiotičke bakterije koje dolaze pojedinačno ili kao mješavine u skladu s listom dopuštenih vrsta definiranih Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i dodacima prehrani.

Kada je zdravstvena tvrdnja u skladu sa Prilogom II. Pravilnika o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama.

b) Zahtjev za izdavanje notifikacijskog broja

Kada proizvod sadrži biljne vrste, ekstrakte biljnih vrsta i druge tvari koje nisu navedene u prilogima Pravilnika o dodacima prehrani, odnosno vitamine, minerale navedene u prilogima Pravilnika ali prelaze maksimalne dopuštene količine navedene u prilogima Pravilnika o dodacima prehrani.

Kada proizvod sadrži zdravstvene tvrdnje za koje još nije dovršena procjena EFSA-e (European Food Safety Authority) i/ili razmatranje Europske komisije, tzv. "on-hold" tvrdnje (to su uglavnom tvrdnje koje se odnose na biljne vrste). Te tvrdnje moći će se koristiti uz prethodno ishodaenje notifikacijskog broja od Ministarstva zdravlja, ali samo dok Europska komisija ne donese konačnu odluku.

Bezreceptni lijekovi (OTC)

Podnošenje zahtjeva za pokretanje postupka u Republici Hrvatskoj prema MRP/DCP ili nacionalnom postupku [32]:

- Način podnošenja zahtjeva za davanje odobrenja u Republici Hrvatskoj propisan je Zakonom o lijekovima (Narodne novine, br. 76/13. i 90/14.) i Pravilnikom o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (Narodne novine, br. 83/13.).
- Zahtjev za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet HALMED-u može podnijeti fizička ili pravna osoba sa sjedištem u Europskoj uniji (u nastavku podnositelj zahtjeva).

Dokumentacija o lijeku [32]:

Uz zahtjev podnositelj zahtjeva obvezan je priložiti dokumentaciju o lijeku koja se dostavlja u obliku Zajedničkog tehničkog dokumenta (u nastavku CTD prema eng. *Common Tehnical Document*).

Osnovni dijelovi CTD-a jesu:

- Modul 1: administrativni podaci i informacije o lijeku,
- Modul 2: sažeci dokumentacije,
- Modul 3: kakvoća,
- Modul 4: izvješća o nekliničkim ispitivanjima,
- Modul 5: izvješća o kliničkim ispitivanjima.

Dokumentacija o lijeku može biti u elektroničkom (eCTD ili Nees oblik) ili papirnatom obliku.

4.7.2. Registrirani proizvodi na hrvatskom tržištu

| NAZIV PROIZVODA | PROIZVOĐAČ/DISTRIBUTER | FARMACEUTSKI OBLIK |
|---|------------------------|--------------------------------|
| 30 Days Candida | Marti Farm | Kapsule |
| ABC Dophilus | Salvus | Prašak |
| Acidosalus Forte | Marinalab | Oralna suspenzija |
| Acidosalus Liquid | Marinalab | Oralna suspenzija |
| Acidosalus Plus | Marinalab | Oralna suspenzija |
| Acidosalus | Marinalab | Vaginalne tablete i suspenzija |
| Acidoverus Milk | Probiotika Viva | Oralna suspenzija |
| Acidoverus sok (mrkva) | Probiotika Viva | Oralna suspenzija |
| Altaflora Elektrol | Multipharm | Kapsule/prašak |
| Bevital SUN | Belupo | Kapsule |
| BFM Pivski kvasac | Biofarm | Kapsule |
| Bifidoverus sok (cikla, kupina, mrkva) | Probiotika Viva | Oralna supenzija |
| Bifidoverus mlijeko (kravlje, kozje) | Probiotika Viva | Oralna suspenzija |
| Bio-kult Candea | Oktal Pharma | Kapsule |
| Bio-kult | Oktal Pharma | Kapsule |
| BioGaia Chew. | Ewopharma | Tablete za žvakanje |
| BioGaia Protetctis | Ewopharma | Oralna suspenzija |
| BioGaia Protetctis ORS | Ewopharma | Prašak |
| Biorela BABY | Milsing | Prašak |
| Biorela Choco | Milsing | Pločica |
| Biorela Daily | Milsing | Kapsule |
| Biorela Kids | Milsing | Tablete za žvakanje |
| Biorela ORS | Milsing | Prašak |

| | | |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|
| Biotop Pivski kvasac | Biofarm | Prašak |
| Bodega Detoxy | Vitaminia | Kapsule |
| Bulardi | Abela Pharm | Kapsule |
| Bulardi Plus | Abela Pharm | Kapsule |
| Compliflora BABY | Hospitalija | Prašak/Oralna suspenzija |
| Compliflora Family | Hospitalija | Kapsule |
| Diarino | PharmaS | Prašak |
| Diarino ORS | PharmaS | Prašak |
| Diastop | Alkaloid | Kapsule |
| Enterogermina | Sanofi | Kapsule/ Oralna suspenzija |
| Fermental | ESI | Kapsule/tablete |
| Ferzym | Specchiasol | Kapsule/otopina |
| Ferzym Junior | Specchiasol | Suspenzija |
| Flobion | Abela Pharm | Kapsule |
| Gynolact | Phoenix | Vaginalne tablete |
| Lactibiane | PiLeJe | Kapsule/prašak |
| Lactobiotic | Fidifarm | Kapsule |
| Lactocare BABY | Actavis | Suspenzija |
| Lactocare Daily | Actavis | Kapsule |
| Lactocare Plus | Actavis | Kapsule |
| Lactocare Fiber | Actavis | Prašak |
| Lactocare STOP | Actavis | Tablete |
| Lactogyn | JGL | Kapsule/vaginalne kapsule |
| Lepicol Baby | Lucas Intertrade | Prašak |
| Linex | Sandoz | Kapsule/prašak |
| Linex FORTE | Sandoz | Kapsule |
| Linex Lady | Sandoz | Kapsule/vaginalne kapsule |

| | | |
|---|---------------|---------------------------|
| Normia BABY | JGL | Suspenzija |
| Normia | JGL | Kapsule/prašak |
| Omni Biotic | Vitality I.P. | Kapsule/prašak |
| Pearls Acidophilus Pearls IC Pearls Kids | Salveo | Kapsule |
| PROBalans | PharmaS | Kapsule |
| PROBalans BABY | PharmaS | Suspenzija |
| PROBalans IMUNO | PharmaS | Kapsule |
| Probiotic Premium | Vitality I.P. | Prašak |
| PROLIFE | JGL | Kapsule/suspenzija |
| Symbiotic+ | Marti Farm | Kapsule/prašak |
| Ultra probiotics | Medikor | Kapsule |
| Ultrabiotique | Medical int. | Kapsule |
| Vivomixx | Proximum | Kapsule/prašak |
| VSL 3 | Proximum | Prašak |
| WAYA | Medis | Kapsule/prašak/suspenzija |

5. ZAKLJUČAK

Na temelju proučene literature i objavljenih radova na području razvoja formulacija proizvoda koji sadrže probiotike, kao i tehnika oblikovanja, mogu se uspostaviti adekvatni procesi i postupci u proizvodnji proizvoda koji sadrže probiotike. S tehnološke strane gledano, najveći izazov probiotičkog pripravka predstavlja činjenica da su u njemu sadržani živi organizmi, osjetljivi na određene uvjete i parametre u proizvodnji, skladištenju i dostavi na ciljano mjesto djelovanja.

Nove tehnologije oblikovanja probiotika omogućuju bolju zaštitu samih bakterija prilikom procesa proizvodnje i izrade formulacija, a posebno pri prolasku kroz probavni sustav (nepovoljni utjecaj niskog pH, žučnih soli i enzima gušterače). Veliki broj патената u području oblikovanja probiotičkih proizvoda ukazuje nam na napredak i inovativnost u razvoju takvih proizvoda. Posebnu pozornost treba obratiti na funkciju probiotika kao nosača cjepiva (antigena) i njihovu sposobnost imunizacije.

Proučavanjem različitih ispitivanja može se zaključiti kako se sve više naglašava specifičnost pojedinog soja i definira se mehanizam djelovanja pojedinih sojeva u odnosu na ostale. Samim time možemo očekivati i razvoj soj-specifičnih formulacija i proizvoda za određenu indikaciju, bilo da se radi o terapijskoj primjeni ili imunizaciji.

6. LITERATURA

1. Sanders ME, Gibson G, Gill SH, Guarner F. Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. *Council for Agricultural Science and Technology (CAST)*, 2007; 36, 1-20.
2. Guarner F, Khan A, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Le Mair T. Probiotics and prebiotics. Milwaukee, *World Gastroenterology Organisation Practice Guideline*, 2008; 1- 45.
3. Stilling, RM, Dinan, TG, & Cryan, JF. Microbial genes, brain & behaviour–epigenetic regulation of the gut–brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, 2014; 13(1), 69-86.
4. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, & Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 2012; 1262-1267.
5. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C & Andersson AF. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, 2014; 63(4), 559-566.
6. Forssten SD, Lahtinen SJ, Ouwehand AC. The Intestinal Microbiota and Probiotics. U: Probiotic Bacteria and Enteric Infections. Malago JJ, Koninkx JFJG, Marinsek – Logar R, urednici, Kantvink, *Springer*, 2011; str. 41 – 60.
7. Soccol CR, Porto de Souza Vandenberghe L, Rigon Spier M, Bianchi Pedroni Medeiros A, Tiemi Yamaguishi C, De Dea Lindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010; 48 (4), 413–434.

8. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 2014; 1– 8.
9. Castellazzi AM, Valsecchi C, Caimmi S, Licari A, Marseglia A, Leoni MC, Caimmi D, Miraglia del Giudice M, Leonardi S, La Rosa M, Marseglia GL. Probiotics and food allergy. *Italian Journal of Pediatrics* 2013; 39:47, 1-8.
10. Corcionivoschi N, Drinceanu D, Stef L, Luca I, Julean C, Mingyart O. Probiotics-identification and ways of action. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 2010; 6(3), 1-11.
11. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 2013; 109(S2), S35-S50.
12. Santos M, Tymczyszyn E, Golowczyc M, Mobili P, Gomez-Zavaglia A. Probiotic Cell Cultivation. *Advances in Probiotic Technology*, 2015; 45.
13. Ansel HC, Allen LV, Popovich NG. Dosage form design: Pharmaceutical and formulation consideration. Ansel's Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. Philadelphia, New York: *Lippincott William & Wilkins*, 2007; 92-141.
14. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 2012; 4(1), 149-163.
15. Serna-Cock L, Vallejo-Castillo V. Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 2013; 7(40), 4743-4753.
16. Smith J, Charter E. (Eds.). *Functional food product development*. John Wiley & Sons 2011.

17. Chávarri M, Marañón I, Villarán MC. *Encapsulation technology to protect probiotic bacteria*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
18. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, & Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of nutrition and metabolism*, 2013.
19. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 2011; 467-483
20. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 2011; 1, 1806-1815.
21. Govender M, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, van Vuuren S, Pillay V. A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*, 2014; 15(1), 29-43.
22. Yadav Nisha R, Bhitre Milind J, Ansari Imran K. Probiotic delivery systems: Application, challenges and prospective. *International Research Journal Of Pharmacy*, 2013; 4(4)
23. Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 2005; 98(6), 1410-1417.
24. Shah NP, Lankaputhra WE, Britz ML, Kyle WS. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 1995; 5(5), 515-521.

25. Okhamafe AO, Amsden B, Goosen MFA. Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitive polymer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. *Journal of microencapsulation*, 1996; 13(5), 497-508
26. Daliri EBM, Lee BH. New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*, 2015; 4(2), 56-65.
27. Sekhar MS, Unnikrishnan MK, Vijayanarayana K, Rodrigues GS, Mukhopadhyay C. Topical application/formulation of probiotics: Will it be a novel treatment approach for diabetic foot ulcer?. *Medical hypotheses*, 2014; 82(1), 86-88.)
28. European Patent Office: PROBIOTIC BACTERIA FOR THE TOPICAL TREATMENT OF SKIN DISORDERS, WO2012150269 (A1), 2012.
Available at:
<http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=WO&NR=2012150269A1&KC=A1&FT=D>. Accessed October 14, 2015.
29. European Patent Office: TOPICAL USE OF PROBIOTIC BACILLUS SPORES TO PREVENT OR CONTROL MICROBIAL INFECTIONS, WO9847374 (A1), 2000.
Available at:
<http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=0975227A1&KC=A1&FT=D>. Accessed October 14, 2015.
30. Scheppler L, Vogel M, Zuercher AW, Zuercher M, Germond JE, Miescher SM, Stadler BM. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 2002; 20(23), 2913-2920.
31. Ricca E, Baccigalupi ., Cangiano G, De Felice M, Isticato R. Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories*, 2014; 13(1), 1-9.

32. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED)
Postupak davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet
Dostupno na:
http://www.halmed.hr/?ln=hr&w=lijekovi&d=postupak_davanja_odobrenja .
Pristupljeno 27. listopada 2015.
33. Solanki HK, Pawar DD, Shah DA, Prajapati VD, Jani GK, Mulla AM, Thakar PM.
Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013.
34. Dhewa T, Pant S, Mishra V. Development of freeze dried synbiotic formulation using a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of food science and technology*, 2014; 51(1), 83-89.
35. Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, del Carmen Villarán M.
Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 2010; 142(1), 185-189.
36. Sleator RD. Designer probiotics: Development and applications in gastrointestinal health. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2015; 6(3): 73-78

KRATICE

| | |
|---------------|--|
| CFU | Colony forming units |
| CDT | Tehnologija kontrolirane dostave |
| CM-HAS | Karboksimetil amilozni škrob |
| CTD | Zajednički tehnički dokument |
| DCP | Decentralizirani postupak registracije lijekova |
| GRAS | Generally Regarded As Safe |
| HALMED | Agencija za lijekove i medicinske proizvode |
| HPA | Os hipotalamus-hipofiza |
| HPMC | Hidroksipropil metilceluloza |
| IR | Trenutno oslobađanje |
| LAB | Lactic acid bacteria, bakterije mlječne kiseline (zajednički naziv za pripadnike roda <i>Lactobacillus</i>) |
| LPS | Lipopolisaharid |
| MRP | Postupak međusobnog priznavanja (<i>Mutual recognition procedure</i>) |
| OTC | Lijekovi koji se izdaju bez liječničkog recepta |
| PCR | Lančana reakcija polimeraze (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PR | Produženo oslobađanje |
| RNA | Ribonukleinska kiselina |
| rRNA | Ribosomska ribonukleinska kiselina |